

Diplomarbeit

SIRT4 Silencing in nichtkleinzelligen Lungenadenokarzinom Zellen

eingereicht von

Thomas Heitzmann

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Lungenzelllabor / Klinische Abteilung für Pulmonologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.rer.nat. Anđelko Hrzenjak

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Seelbach, am 01.06.2018

Thomas Heitzmann eh

Danksagungen

Ich möchte meinen Dank allen ausdrücken, die mich geprägt und zum vollendeten Studium geführt und unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Professor Anđelko Hrzenjak der in herzlicher und geduldiger Weise die Laborarbeit gelehrt und mir die Konventionen wissenschaftlicher Arbeit vermittelte sowie dem gesamten Team der Zellkultur der Grazer Pulmologie und den Kolleginnen und Kollegen des Ludwig Boltzmann Instituts für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft.

Zusammenfassung

Bei fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) ist die Chemotherapie mit Cisplatin oft die einzige Therapiemöglichkeit. Die Resistenzentwicklung während fortschreitenden Behandlungszyklen gegen dieses Medikament ist das größte Problem bei NSCLC und vermindert die Überlebensrate stark. Veränderte Expressionsmuster von verschiedenen Rezeptoren, Transportmolekülen und Enzymen der Zellzykluskontrolle und des Metabolismus in Cisplatin-sensiblen Tumorzellen können zur Resistenz gegen Cisplatin führen. Wir konnten in unseren Screening Studien herausfinden, dass Sirtuin-4 (SIRT4) in Cisplatin-resistenten NSCLC Zellen vielfach stärker exprimiert ist im Vergleich zu nichtresistenten, parental Zellen. In unserem Projekt konnten wir Sirtuin-4-Silencing in Cisplatin-resistenten NSCLC Zelllinien optimieren. Das ermöglicht die Auswirkungen von SIRT4 auf Zellproliferation und auf Cisplatinresistenz zu untersuchen und molekulare Mechanismen in NSCLC besser zu verstehen.

Abstract

In advanced stages of non-small cell lung cancer (NSCLC) cisplatin treatment is often the only possible therapy. Development of chemotherapy resistance is the major problem in defeating NSCLC and causes a miniscule survival rate. Deregulated gene expression of different receptors, transport molecules, cell cycle regulators and metabolic enzymes can lead to development of cisplatin resistance in initially cisplatin sensible cells. Our group found several histone deacetylases being overexpressed in cisplatin resistant cell lines compared to cisplatin sensible, parental cell lines. In this work we show the optimization of Sirtuin 4 (SIRT4) silencing in cisplatin resistant NSCLC cells. This should enable us to determine the effects of the silenced SIRT4 on cell proliferation and cisplatin resistance and may lead to a better understanding of the molecular mechanisms in NSCLC.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	2
Zusammenfassung	3
Abstract.....	3
1 Einleitung.....	6
1.1 Cisplatin Wirkungsweise	8
1.2 Resistenzmechanismen	10
1.3 Histon Code	11
1.4 Histondeacetylasen (HDACs)	12
1.5 HDAC Inhibitoren.....	13
1.6 SIRT4.....	15
1.7 HDAC11.....	18
1.8 Gen Silencing.....	18
2 Material und Methoden	21
2.1 Zellkultur.....	21
2.1.1 Verwendete Zellen	21
2.1.2 Auftauen von Zellen	21
2.1.3 Umgang mit Zellen.....	22
2.1.4 Splitten von Zellen.....	23
2.1.5 Zellstocks wegfrieren.....	25
2.1.6 Versuchsvorbereitung.....	25
2.2 Transfektion mit siRNA	25
2.3 RNA Analyse	26
2.3.1 RNA Isolation und Aufarbeitung.....	26
2.3.2 Reverse Transkription.....	27
2.3.3 qRT-PCR	29
2.4 Proteinanalyse.....	32
2.4.1 Proteinernte und Isolierung	32
2.4.2 Westernblot/Immunoblot	33
2.4.3 Vorbereitung der Elektrophoresegele.....	33
2.4.4 Proteinmengenbestimmung und -normierung.....	34
2.4.5 Probenvorbereitung	36
2.4.6 Laden des Gels.....	36
2.4.7 Elektrophorese	37

2.4.8	Tank Transfer (Wet Electroblotting)	38
2.4.9	Blockierung	40
2.4.10	Antikörperinkubation	40
2.4.11	Immundetektion	40
2.4.12	Proteinladekontrolle.....	42
2.4.13	Densitometrische Auswertung	43
2.5	Materialliste	44
2.5.1	Zellkultur.....	44
2.5.2	Transfektion	44
2.5.3	RNA Analyse.....	45
2.5.4	Proteinanalyse	45
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Silencing Effekte mit SIRT4 und HDAC11 siRNA: Optimierung von Transfektionsreagenz und siRNA Konzentration	48
3.1.1	A549, Cisplatin-resistent: HDAC11 Silencing, JetPrime, 20 nM / 50 nM.....	49
3.1.2	SK-MES, cisplatin-resistent: Sirt4 Silencing, JetPrime, 20 nM / 50 nM.....	50
3.1.3	SK-MES, Cisplatin-resistent: HDAC11 Silencing, JetPrime, 20 nM / 50 nM	51
3.1.4	Testung von Effektene Transfektionsreagenz in SK-MES Zellen	52
3.1.5	A549, Cisplatin-resistent: Sirt4 Silencing, JetPrime, 10 nM / 40 nM / 80 nM	54
3.1.6	A549, cisplatin-resistent: HDAC11 Silencing, JetPrime, 10 nM / 40 nM / 80 nM .	55
3.2	Vergleich der Expression von Sirt4 und HDAC11 in parentalen und Cisplatin-resistenten A549.....	56
3.2.1	Sirt4 Silencing in cisplatinresistenten A549.....	58
3.3	Proteinebene	59
4	Diskussion.....	70
5	Literaturverzeichnis.....	74

1 Einleitung

Lungenkrebs ist eine der häufigsten Krebsarten und die Krebsform mit höchster Sterblichkeit. Viele Krebsarten befinden sich auf dem Rückzug - nicht so der Lungenkrebs. In den letzten 50 Jahren haben sich seine Inzidenz um 249 Prozent und seine Mortalität um 259 Prozent erhöht. Fünfundsiebzig Prozent der Lungenkrebserkrankungen sind nicht kleinzellige Lungenkarzinome –Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) [1]. Hauptproblem bei NSCLC Patientinnen und Patienten ist die späte Diagnose der Krankheit: In frühem Stadium ist das Lungenkarzinom asymptomatisch. Symptome wie Hämoptysen, Schmerzen oder B Symptome, Nachtschweiß, Fieber, Gewichtsabnahme, also systemische Zeichen einer verzehrenden Krankheit bzw. der Immunantwort darauf, sind Ausdruck fortgeschrittener Stadien. Nur 5% der Patientinnen und Patienten mit Bronchialkarzinom überleben mehr als 5 Jahre – meistens bei früher Zufallsdiagnose mit erfolgreicher chirurgischer Therapie [1]. Ein Screening existiert nicht, bei einem kleinen Teil der Patientinnen und Patienten wird ein Lungenkarzinom zufällig im Rahmen bildgebender Thoraxdiagnostik aus anderer Indikation heraus entdeckt. Die Verdachtsdiagnose wird radiologisch per CT bzw MRT gestellt und nach transthorakaler Biopsie wird das primäre Lungenkarzinom pathologisch gesichert und differenziert. Es folgt eine Ausbreitungsdiagnostik: Metastasen können beim NSCLC in fast allen Regionen des Körpers auftreten. Die häufigsten Lokalisationen sind Parenchym und Lymphknoten der ipsi- oder kontralaterale Lunge, Skelett, Leber, Nebennieren und ZNS [2]. Aufgrund der Befunde folgt die Klassifikation in Stadien im TNM System nach Größe, Befall der Lymphknoten und Fernmetastasen bzw. NSCLC-spezifisch in UICC 7 Stadien - hiervon hängt die weitere Behandlungsstrategie ab. Im Stadium 1 ohne Lymphknotenbefall und im Stadium 2 mit befallenen regionalen Lymphknoten verspricht eine chirurgische Entfernung der Tumormasse Erfolg. In Stadium 3 mit Befall der Lymphknoten über den Lungenhilus hinaus bzw. im Stadium 4 mit Fernmetastasen hängt der Behandlungserfolg wesentlich von der Chemotherapie ab. Die Überlebenschancen in fortgeschrittenen Stadien, bei späterer Diagnose sind bisher schlecht.

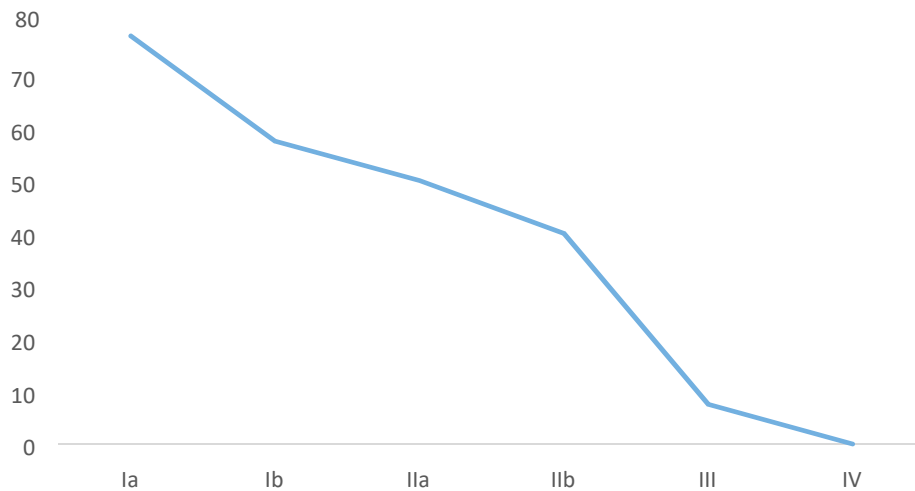


Abbildung 2. 5 Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit vom Stadium der Krankheit bei Diagnosestellung. Eigene Grafik mit Daten aus [2].

Leider werden 35 - 40 % der Patientinnen und Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom erst im Stadium IV diagnostiziert. Bei der Mehrzahl der Patientinnen und Patienten ist der Therapieanspruch wegen schlechter Wirksamkeit der Chemotherapie daher palliativ [2]. Die Prognose dieser Patientinnen und Patienten könnte durch eine wirksamere Chemotherapie verbessert werden.

1.1 Cisplatin Wirkungsweise

Platinderivate gehören zu den wirksamsten Therapeutika, die kombiniert mit anderen Zytostatika und Strahlentherapie den Standard stellen, sei es neoadjuvant, adjuvant oder palliativ. Palliativ kann kombiniert mit Taxanen, Gemcitabin, Vinorelbin oder Pemetrexed in 15-30% eine Remission und eine mittlere progressionsfreie Überlebenszeit von 3-5 Monaten erreicht werden [2].

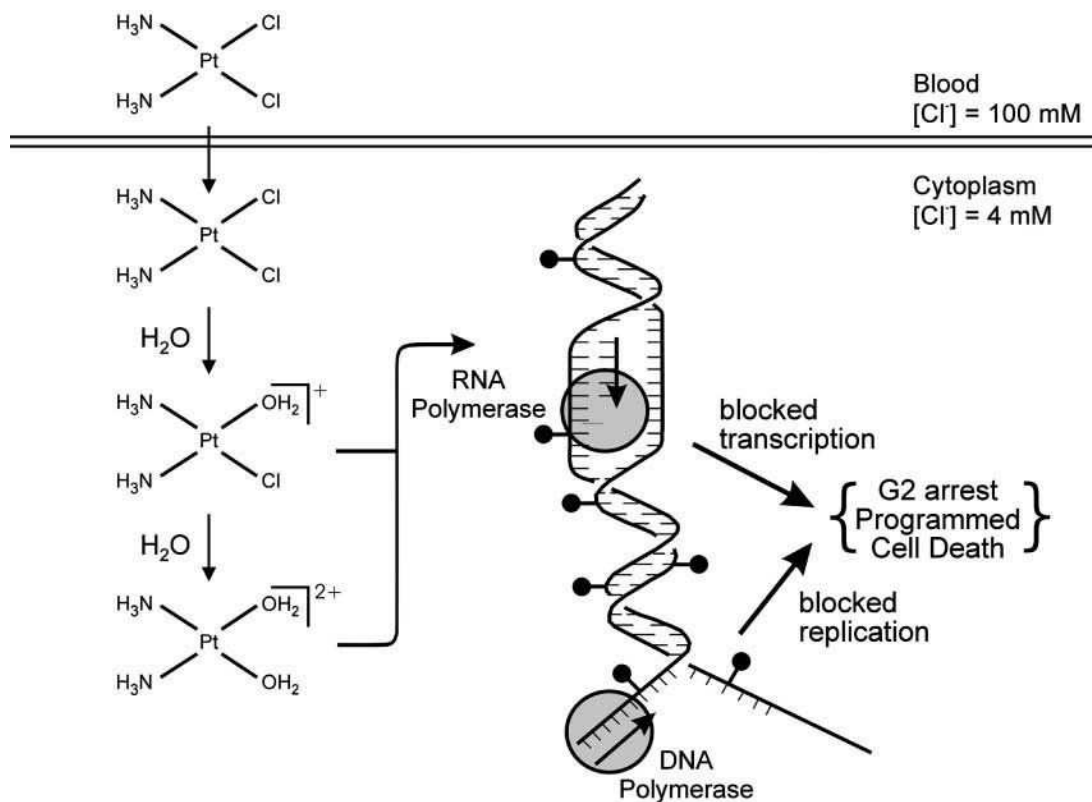


Abbildung 3. Wirkungsweise von Cisplatin [3].

Kartalou et al [3] haben folgende Wirkungsweise dargestellt:

Cisplatin wird intravenös appliziert, wo es durch die hohe Cl^- Konzentration mit seinen Cl^- Liganden verbunden bleibt. In der Zelle mit niedriger Cl^- Konzentration werden die Cl^- Liganden durch Wassermoleküle ersetzt und die Verbindung positiv geladen. Es können Makromoleküle mit RNA und DNA geformt werden, durch die entstehenden Intra- bzw. Interstrang-Vernetzungen werden Transkription und Replikation behindert. Zusätzlich werden Punktmutationen ausgelöst, die DNA-Reparatur verhindert und die Telomeraseaktivität gehemmt. All dies führt zur Apoptose der malignen Zellen.

Probleme bereiten spezifische schwere Nebenwirkungen: Übelkeit und Erbrechen, Nephrotoxizität, Polyneuropathie, Ototoxizität, Hämatoxizität, Elektrolytverschiebungen, Kardiotoxizität und Diarrhoe [3], welche die Dosierung einschränken. Andere Platinverbindungen zB. Carboplatin und Kombinationstherapien haben bisher wenig Verbesserung erbracht. Obwohl 30-40% der Patientinnen und Patienten mit metastatischem NSCLC auf Kombinationstherapien ansprechen, erleiden die meisten von Ihnen einen Rückfall innerhalb eines halben Jahres.

Es werden also entweder präexistente resistente Zellen durch den Selektionsdruck bevorzugt oder die Zellen entwickeln Resistenzmechanismen [4].

1.2 Resistenzmechanismen

Perez [5] vermutet folgende Resistenzmechanismen (Abb. 4), die entweder den Schaden in der Zelle vermindern oder die Antwort der Zelle auf entstandene Schäden verändern können.

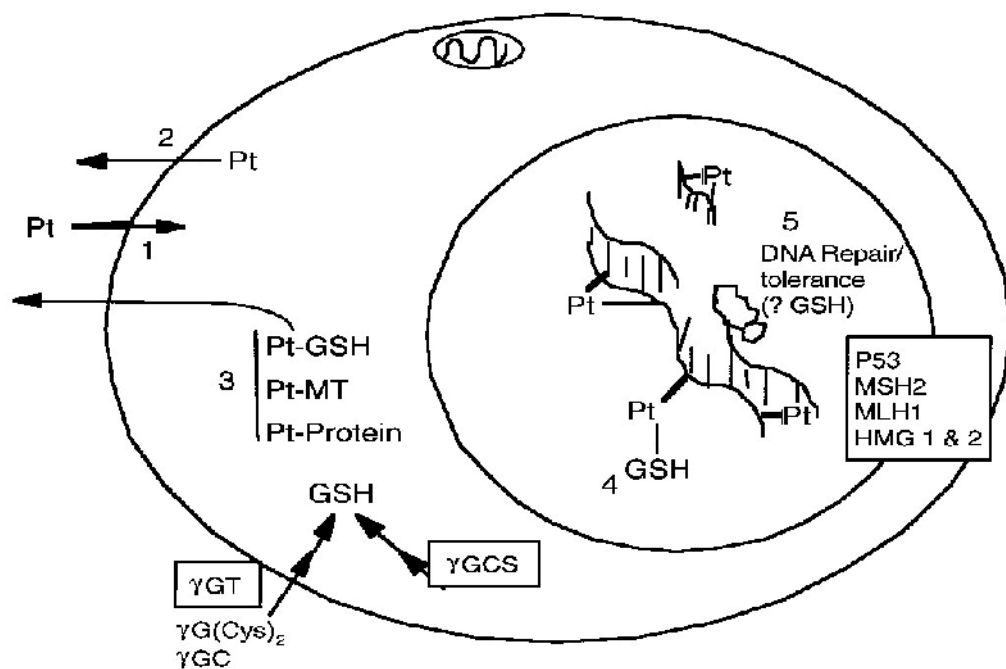


Abbildung 4. Resistenzmechanismen gegen Cisplatinbehandlung [5].

Durch Veränderungen an den Transportproteinen der Zellmembran kann der Influx von Cisplatin in die Zelle verringert oder der Efflux erhöht werden. Eine Kovalente Bindung durch Nucleophile im Cytosol (Metallothionin, Methionin, Glutathion) mit dem Platin-Agens kann eingegangen werden, mit einem nachfolgenden aktiven Transport aus der Zelle. Die Aktivität von Reparaturenzymen kann verändert werden oder die Toleranz gegenüber Schäden in der Apoptosemodulation kann zunehmen. Diese Mechanismen sind noch Gegenstand der Forschung und werden durch Veränderungen in Genetik oder Epigenetik hervorgerufen.

Die genetischen Mutationen in Tumoren sind mittlerweile durch DNA Sequenzierung gut erforscht und werden als prognostische und therapiebestimmende Faktoren klinisch verwendet. Die aberrante Expression vorhandener Gene ist ein weiterer Faktor in neoplastischem Wachstum und Transformation. Neben der DNA-Methylierung und der Funktion regulatorischer RNAs bieten die Mechanismen, welche die Genexpression über die Chromatinstruktur steuern, vielversprechende Ziele der Krebstherapie da sie medikamentös zu beeinflussen sind [6].

Wir arbeiten an einem besseren Verständnis der Wirkung von Histondeacetylasen in der Steuerung von Zellzyklus und Metabolismus vor allem in Hinblick auf Cisplatinresistenz. So konnte bereits die hypoxieinduzierte Cisplatinresistenz in NSCLC durch Einsatz von Panobinostat, einem HDAC Inhibitor, aufgehoben werden [7]. Weitere Möglichkeiten für kombinierte Therapien von Chemotherapeutika mit HDAC-Inhibitoren die bereits jetzt in Studien gute Wirksamkeit [8] bei geringen Nebenwirkungen zeigen [9] können so entdeckt werden.

1.3 Histon Code

Die Chromatinstruktur im Zellkern wird bestimmt durch Proteinkomplexe, sogenannte Histone. Histone organisieren die DNA im Zellkern. Die DNA ist um jeweils 8 Histonproteine geschlungen und formt damit ein Nukleosom. Diese Histonproteine besitzen Lysinreste, welche durch Acetyltransferasen (HATs) acetyliert bzw. durch Histondeacetylasen (HDACs) deacetyliert werden können [10]. Dadurch entsteht der sogenannte „Histon Code“ (Abb.5). Der Acetylierte Zustand der Histone ermöglicht eine Interaktion mit Transkriptionsmolekülen und aktiviert betroffene Gene. Werden Histone durch HDACs deacetyliert, entsteht eine positive Ladung und damit eine erhöhte Affinität der Lysinreste zum negativ geladenen Phosphatgerüst der DNA. Die DNA wird dichter gepackt und ist für Transkriptionsfaktoren schlechter zugänglich. Bei den betroffenen Genen führt die Deacetylierung damit zum Silencing [11].

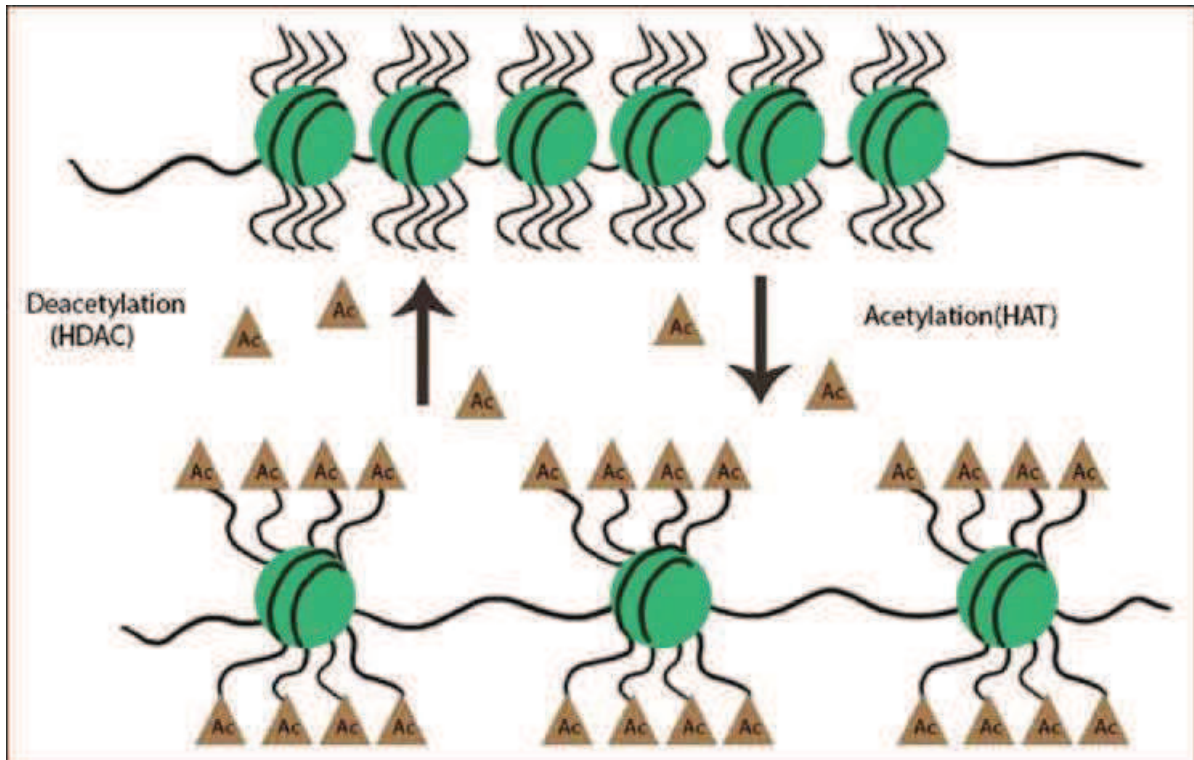


Abbildung 5. Der Einfluss von Acetylierung und Deacetylierung auf die Chromatinstruktur (6).

1.4 Histondeacetylasen (HDACs)

Die histondeacetylierenden Enzyme werden in vier Klassen unterteilt, die den homologen HDACs in Hefe entsprechen. Die Klasse I entspricht dem Protein RPD3 in Hefe und besteht aus den Isoenzymen HDAC1, 2, 3, und 8. Klasse II entspricht dem HDA1 Protein in Hefe und enthält HDAC4, 5, 7, 9, 6, und 10 (Abb. 6). Diese beiden Klassen benötigen Zn^{2+} als Kofaktor. Klasse III entspricht dem SIR2 in Hefe, dem „silent mating type information regulation 2“ deshalb werden sie auch Sirtuine genannt. Diese Klasse enthält die Sirtuine SIRT1-7. Im Gegensatz zu den anderen Klassen sind Sirtuine NAD^+ abhängig. In Klasse IV findet sich das zuletzt gefundene Protein HDAC11, welches als kleinste Histondeacetylase weder zu Rpd3 noch zu Hda1 homolog ist und damit eine eigene Gruppe begründet [12, 13].

Group	Class	Name	Location in cell	Location in body
Classical (Zn dependent)	Class I (Rpd3)	HDAC1	Nucleus	Ubiquitous
		HDAC2		
		HDAC3		
		HDAC8		
	Class IIa (Hda1)	HDAC4	Nucleus/ cytoplasm	Tissue specific
		HDAC5		
		HDAC7		
		HDAC9		
	Class IIb (Hda1)	HDAC6	Cytoplasm	Tissue specific
		HDAC10		
	NAD dependent	Class IV (Rpd3/Hda1)	HDAC11	Nucleus/ cytoplasm
Class III		SIRT (1-7)		

HDAC=Histone deacetylase, NAD=Nicotinamide adenine dinucleotide, SIRT=Sirtuin

Abbildung. 6. Ordnung der Histondeacetylasen in Klassen [9].

In vielen Krebsarten kann eine Dysbalance von HAT und HDAC Aktivität beobachtet werden. HDACs können proonkogen wirken indem sie Gene welche in Differenzierung, Apoptose und Zellzyklusarrest involviert sind unterdrücken [14,15]. Ihre Inhibition mag daher therapeutisch nutzbar sein [16].

1.5 HDAC Inhibitoren

HDAC Inhibitoren (HDACIs) führen zu verstärkter Acetylierung von Histonen. Das vermindert die positive Ladung der Histone und damit ihre Affinität zur DNA. Das Chromatin wird somit aufgelockert und die Transkription erleichtert. Ihre Wirkung beschränkt sich allerdings nicht auf Histone, auch DNA-bindende Proteine, Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionsproteine, DNA-Reparaturproteine und Chaperone werden beeinflusst – dies hat modulatorische Wirkung auf Apoptoseprozesse. Bereits nachgewiesen sind diese bei p53, Hsp90 und Tubulin [17, 18].



Abbildung 7. Effekte der Histondeacetylasen-Inhibitoren [23].

Abbildung 7 gibt einen Überblick über die Vielzahl beobachteter Mechanismen ihrer Toxizität. Sie führen über die Aktivierung von Durch Phosphorylierung des Retinoblastom Proteins oder der Acetylierung von perizentromerem Chromatin, der Vermehrung Reaktiver Sauerstoffspezies, Apoptoseinduktion, der Inhibition von DNAREparaturmechanismen oder Antiangiogenese zu vermehrtem Zelltod [19,20,21,22]. Die Struktur, Aktivität und Spezifität der HDACis ist uneinheitlich. Allen gemeinsam ist eine Zink-bindende Domäne, eine Capping Group und ein "Straight Chain Linker", der beide verbindet. Man unterteilt sie in die Klassen der kurzen Fettsäuren, Hydroxamidsäuren, Zyklische Peptide und synthetische Benzamide [23].

Die Histondeacetylasen die bei der Resistenzentwicklung auf Cisplatin in Lungenkarzinomen mitwirken, dem Forschungsgebiet unserer Gruppe, sind bisher unbekannt. Zu ihrer Identifikation wurde eine Vergleichsstudie mit Tumorzellen durchgeführt. Wir konnten von Dr. M. Barr (College of the Holy and Undivided Trinity of Queen Elisabeth, Dublin, Irland) mehrere von ihm erzeugte Cisplatin-resistente und deren

parentale Lungentumorzelllinien requirieren. Es wurde die Expression sämtlicher HDACs zwischen parentalen und Cisplatin-resistenten Zellen auf RNA-Ebene gescreent. Dabei konnte eine Überexpression von den Histondeacetylasen SIRT4 und HDAC11 in cisplatinresistenten A549 (Adenokarzinomzellen) und SK-MES (Zellen eines squamösen Lungenkarzinoms) im Vergleich zu deren parentalen Zellen gefunden werden.

1.6 SIRT4

Sirtuine sind NAD-abhängige Deacetylasen, homolog zum SIRT2 Protein in Hefezellen [24]. Sieben Sirtuine wurden bisher entdeckt, sie teilen eine katalytische Domäne mit dem SIRT2, andere Teile ihrer Sequenzen sind aber sehr variabel gestaltet. SIRT3, SIRT4 und SIRT5 sind in Mitochondrien lokalisiert [25, 26].

SIRT4 ist in auffällig hoher Konzentration in Herz, Niere, Hirn und Leber zu finden. Im Unterschied zu den anderen HDACs hat SIRT4 eben keine deacetylierende Funktion, sondern zeigt sich als ADP-Ribosyltransferase an Histonen und bovinem Serumalbumin [27]. Es ist in unterschiedlichen Krebsarten verstärkt exprimiert, so in Leber-, Nieren-, Hodenkarzinomen, in Sarkomen der Skelett- und vaskulären glatten Muskulatur, außerdem auch physiologisch in den insulinproduzierenden Langerhans-Zellen [28]. Bisher beschriebene Funktionen des SIRT4 sind in der Abbildung 8 zusammengefasst.

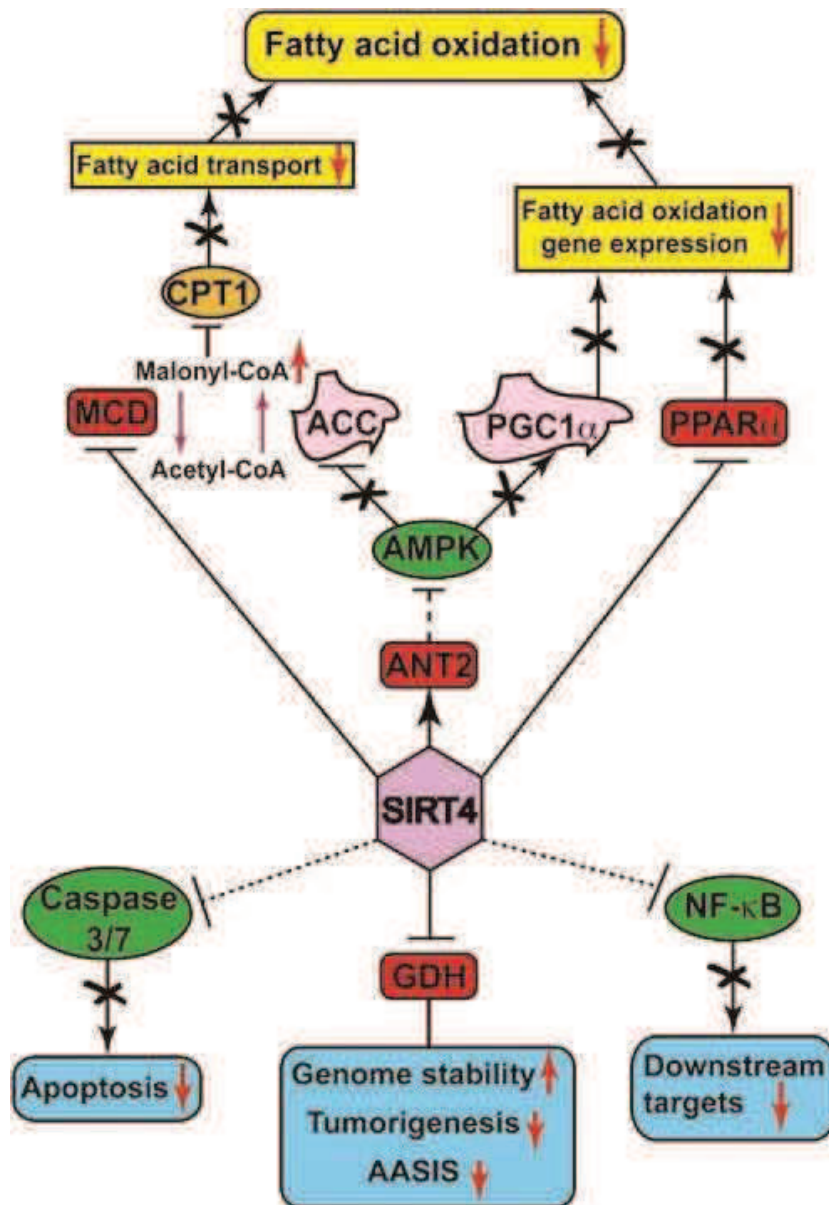


Abbildung 8. Überblick über die bekannten Funktionen von SIRT4 [29].

Die direkten Substrate von SIRT4 sind als rote Rechtecke dargestellt, Downstream-Ziele in Grün. Die Auswirkungen auf den Fettmetabolismus oben in gelben Kästen, unten in blauen Kästen die Wirkungen auf Apoptose, Genomstabilität und Immunmodulation.

SIRT 4 besitzt zum einen metabolische Regulationsfunktion im Fettsäurenstoffwechsel. Es deacetyliert die Malonyl CoA Decarboxylase bei Nährstoffmangel und verringert damit dessen Aktivität. MalonylCoaDecarboxylase katalysiert die Umwandlung von MalonylCoA zu AcetylCoA das zur Synthese von Fettsäuren benötigt wird. SIRT4 hindert also die Synthese von Fettsäuren. SIRT4 KO Mäuse zeigten vermehrte Fettsäureoxidation, sie waren

gegen diätinduzierte Adipositas immun [29]. ANT2 ist ein Protein der inneren Mitochondrienmembran, das für den Austausch zwischen mitochondrialem ATP und cytosolischem ADP zuständig ist. Über eine Signalkaskade nimmt auch dieser Mechanismus Einfluss auf den Fettsäurenmetabolismus: Der Fettsäureinflux wird verringert, die Fettsäureoxidation herunterreguliert [30]. Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor α (PPAR α) ist ein Transkriptionsfaktor der die Expression von Genen die für den Fettsäurenkatabolismus nötig sind stimuliert. Es wird durch SIRT4 also die Expression von Enzymen der β -Oxidation, des Abbaus von Fettsäuren, unterdrückt [31, 32].

SIRT4 moduliert auch den Apoptosemechanismus. Unter Hypoxie ist SIRT4 Expression auf RNA und Protein Ebene deutlich vermindert. Eine Überexpression von SIRT4 konnte die Überlebensfähigkeit von H9c2 Cardiomyozyten steigern, die Caspase3/7 Aktivität und dadurch die Apoptoserate wurden verringert. Eine SIRT4 Silencing Transfektion brachte das gegenteilige Resultat. Mitochondrien sind Kernbestandteil des Apoptosemechanismus. Cytochrom C, Apaf1 und Procaspase-9 aus den Mitochondrien interagieren um das Apoptosom zu formen, welches wiederum Caspase 3 aktiviert. Hypoxie vermehrte aktivierte also gespaltene Caspasen 3 und 9. SIRT4 Silencing steigerte deren Gehalt weiter während SIRT4 Überexpression deren Gehalt verminderte. Liu et al. vermuten einen regulatorischen Effekt von SIRT4 durch Modulierung des Verhältnisses von Procaspase 9 zu Caspase 9 und Procaspase 3 zu Caspase 3. Außerdem wurde die Bax-Translokation ins Mitochondrium, ein weiterer Schritt der Apoptose, durch SIRT4 Silencing verstärkt und dessen Überexpression vermindert [34].

SIRT4 inhibiert die Glutamat Dehydrogenase (GDH). Fernandez-Marcos et al. untersuchten die Wirkung von SIRT4 im Rahmen des DNA-Reparatur-Systems (DRS). SIRT4 erhöht die antioxidative Kapazität der Zelle durch Steigerung der NADPH Produktion über den Pentosephosphatweg [34,35]. Es verringert Glukoseaufnahme und Glykolyse [36], der Pentosephosphatweg wird aktiviert, die Aufnahme an Glutamin und an Zwischenprodukten des Krebszyklus nimmt derweil ab [35].

Jeong et al. konnten zeigen, dass genotoxischer Stress mit konsekutivem Zellzyklusarrest und DNA Reparatur SIRT4 Expression induzierte, welche wiederum den Glutaminmetabolismus hemmte. Damit wirkt SIRT4 über die GDH-Unterdrückung DNA-stabilisierend.

SIRT4-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Inzidenz an Lungentumoren und eine erhöhte konstitutionelle GDH Aktivität. Das legt nahe, dass die niedrigere SIRT4 Expression die verringerte DNA-Stabilität bedingt. Auch unter Bestrahlung reduzierte sich die GDH-Aktivität nicht, wie das in Wildtyp-Zellen beobachtet wird, die Anaplerose scheint gestört [37]. Dieser Mechanismus bietet außerdem eine mögliche Erklärung für die Wirkung von SIRT4 in Lymphomzellen. Maligne B-Zellen in Mäusen zeigen erhöhte Glutaminaufnahme und GDH-Aktivität. Die Überexpression des Sirtuins führte zu Wachstumsretention und sensibilisierte die Zellen für Glucosemangel und Glycolyseinhibitoren [38].

SIRT4 inhibiert die Aktivität von NF- κ B und unterdrückt damit die Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und E-Selektin in pulmonalen Endothelzellen. Diese wirken mit in der zellulären Immunantwort. In Lungenendothelzellen konnte durch SIRT4 Überexpression die Entzündungsreaktion auf Zigarettenrauch reduziert werden [39].

1.7 HDAC11

HDAC11, die zuletzt beschriebene und kleinste Histondeacetylase, ist die einzige der Gruppe IV. Sie zeigt funktionelle Ähnlichkeit zu Gruppe I und II [40]. HDAC11 ist in Nieren, Hirn, Hoden, Herz und Skelettmuskel stark exprimiert und wird mit Immunfunktionen und Oligodendrozytenentwicklung in Verbindung gebracht [41]. Die Unterdrückung von HDAC11 induziert Apoptose in Hodgkin Lymphomen und vermehrt die Produktion von TNF α und IL17 [42].

In anderen myeloproliferativen Neoplasien zeigte sich klinisch eine Verminderung von Splenomegalie und metabolischen Begleitsymptomen bei HDAC11 Silencing [43]. Die genauen Funktionen sind noch unbekannt, deshalb war die Untersuchung dieser Histondeacetylase besonders interessant.

1.8 Gen Silencing

RNA Interferenz ist ein physiologischer Steuerungsmechanismus in Zellen. In den 1980er Jahren wurde eine Translationsinhibition durch kurze RNA-Stücke in *E. coli* entdeckt [44]. Im Jahr 1993 konnte die Translationsmodulation auch in Eukaryoten durch antisense RNA im Wurm *Caenorhabditis elegans* nachvollzogen werden [45, 46]. Der Mechanismus erlangte geringe Aufmerksamkeit, bis 2001 eine Vielzahl weiterer kleiner RNA-Moleküle entdeckt wurden, die sogenannten microRNAs [47-49]. MicroRNAs (miRNAs) sind von der Zelle selbst durch DNA-Translation gebildete RNA-Stücke für posttranskriptionelle Steuerung. Der Effekt des posttranskriptionellen Gensilencing wurde zuvor schon in Pflanzen beobachtet, klonierte Transgene konnten hier zu einer Inhibierung der Genexpression führen [50, 51].

Fire und Mello gelang es schließlich den Mechanismus der RNAi zu erklären und *in vivo* in dem Wurm *C. elegans* für Gensilencing einzusetzen [52]. In Wirbeltieren verhinderte zunächst ein Abwehrmechanismus („anti-viral response“) gegen längere dsRNA, der zur Apoptose führt, eine Anwendung der RNAi. Dieser konnte durch Anwendung kürzerer dsRNA Stücke von ca. 21 Nukleotiden Länge überwunden werden [53]. Diese siRNA werden verwendet, um die Ausprägung von Genen zu unterdrücken bzw. einen „Gen-Knockdown“ zu erreichen.

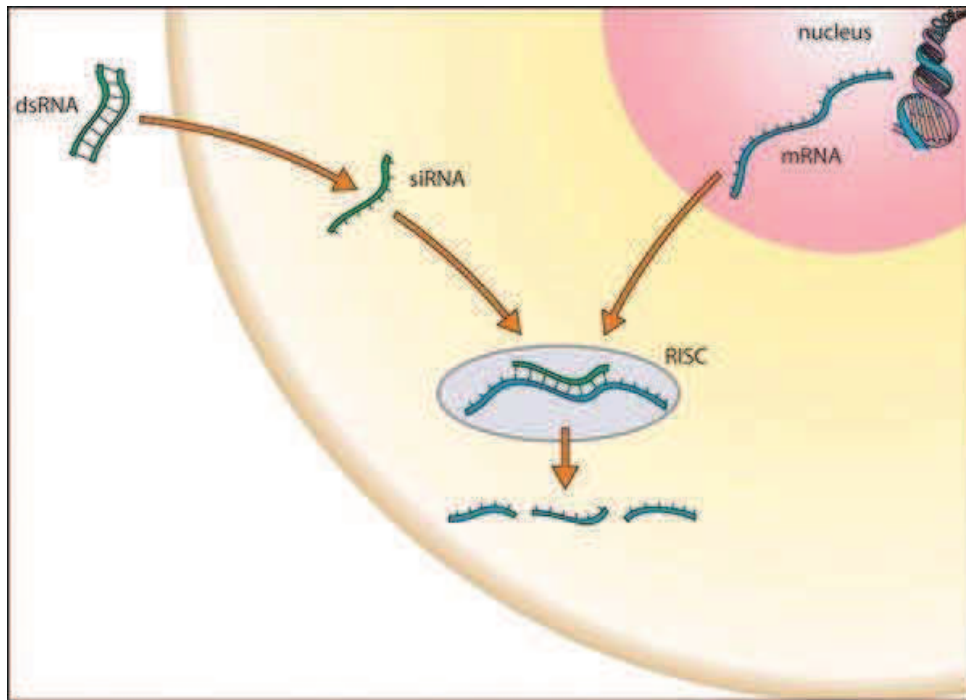


Abbildung 9. Funktionsweise von siRNA [54].

Gelangt doppelsträngige RNA in die Zelle wird sie von einer siRNA Endoribonuklease, dem “Dicer”, an einen Proteinkomplex, den RNA induced Silencing Complex (RISC) übergeben. Findet dieser aktivierte RISC Komplex zelleigene einzelsträngige mRNA, die zur siRNA komplementär ist, baut er diese ab (Abb. 9). “Gen-Knockdown” als Werkzeug zur Ausschaltung von Genen kann zur Untersuchung deren Funktion verwendet werden und ist dabei weniger aufwendig als konventioneller “Gen-Knockout”.

Unsere Arbeit untersucht die Wirksamkeit dieser Methode im Silencing von SIRT4 und HDAC11 in cisplatinresistenten A549 und SK-MES Lungenkarzinomzellen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Verwendete Zellen

Unsere Arbeitsgruppe konnte parentale und Cisplatin-resistente A549 Zellen von Dr. Martin P. Barr (Thoracic Oncology am Institute of Molecular Medicine des Trinity Centre for Health Sciences St. James's Hospital & Trinity College Dublin, Irland) bekommen. Es handelt sich bei dieser Zelllinie um Lungenadenokarzinom Zellen. Cisplatin-resistente A549 Zellen wurden aus einer üblichen A549 Zelllinie durch schrittweises Erhöhen der Cisplatin-Konzentration im Medium über 12 Monate generiert.

Zellen wurden in sterilen Zellkulturflaschen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS – fetal calf serum) mit Zusatz von 1 % Glutamin versorgt. Um bakterielle Kontamination der Zellen bzw. Medien zu vermeiden, enthielten unsere Medien zusätzlich 1% Penicillin und Streptomycin. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2. Sie wurden im Inkubator bei 37 °C mit 95-100 % Luftfeuchte, und 5% CO₂ am Leben gehalten und weiter gezüchtet.

2.1.2 Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden auf Trockeneis gefroren geliefert und zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert, zentrifugiert (300 rpm, 5 Min., Raumtemperatur – RT) und das Medium wurde abgesaugt, um den toxischen Kälteprotektor Dimethylsulfoxid (DMSO) zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert und in 75 cm² Kulturflaschen gegeben.

2.1.3 Umgang mit Zellen

Die A549 Zellen wachsen mit einer Verdoppelungszeit von ca. 24 h und nach 3-5 Tagen (je nach Zelldichte) werden die Nährstoffe im Medium aufgebraucht. Das wurde verhindert durch rechtzeitigen Mediumwechsel – der Zustand des Mediums wird durch den pH-Indikator Phenolrot angezeigt. Ein Farbumschlag ins gelbe bedeutet einen sauren pH-Wert durch den zellulären Metabolismus. Andererseits wurde die Dichte der Zellen täglich unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert (Abb. 10). Füllten die Zellen die Gesamte Fläche aus, waren sie also „dicht gewachsen“ (konfluent) wurden sie „gesplittet“. Dieses Splitten ist notwendig, um eine Wachstumshemmung durch Zell-Zell-Kontakt zu vermeiden.



Abbildung 10. A549 Zellen im Phasenkontrastmikroskop bei einer Zelldichte von ca. 85-90%. Vergrößerung, 100x, eigenes Foto.

2.1.4 Splitten von Zellen

Die Zellen wurden weitergezüchtet indem die adhärennten Zellen, sobald dicht gewachsen, durch Trypsin von der Kulturflasche gelöst wurden. Dazu wurde das Medium (mit 10% PCS) abgesaugt und die Zellen mit 5 mL PBS gespült. Dieser Schritt ist wichtig damit die FCS-Reste entfernt werden; diese würden die enzymatische Wirkung des Trypsins inhibieren. Anschließend wurden die Zellen mit 2 mL Trypsin 5 Min. bei 37°C inkubiert. Nach phasenkontrastmikroskopischer Kontrolle der Ablösung wurde die Andauung durch das Trypsin mit 5 mL Medium mit 10% FCS gestoppt. Die Zellen wurden nach Zentrifugation für 5 Min. bei 400 rpm und Absaugen des alten Mediums in 10 mL frisches Medium resuspendiert und die Zellzahl wurde mit dem Casy Zellzähler bestimmt.

2.1.4.1 OLS Casy Zellzähler

In 10 mL des gerätespezifischen Messpuffers (Casy Tone) wurden 50 µL der Zellsuspension zugefügt (Verdünnungsfaktor 1:200). Durch die Zellmembranen wird die Passage elektrischen Stroms in der Durchflusskapillare behindert. Dadurch kann das Gerät die Anzahl an Zellen/Zelltrümmer sowie deren Größe in der Probe auflösen. Drei Messungen wurden gemittelt, um eine genaue Zellzahl zu bekommen. Durch ein Zelltypspezifisches Protokoll wurden aus den Rohdaten folgenden Werte ermittelt (Abb. 11):

1. Die Dichte der Zellsuspension (Zellzahl pro Volumen, Verdünnung 1:200)
2. Der Aggregationsfaktor – beschreibt wie gründlich die Zellen resuspendiert sind und wie zuverlässig ist die Zellzählung.
3. Die Viability – der Anteil lebender Zellen zu Zelltrümmern anhand von Größen-Cutoffs.

Mit einer 1:200 Verdünnung konnte die beste Messgenauigkeit erreicht werden. Nach erfolgreicher Trypsinierung und Resuspendieren konnten Aggregationsfaktor-Werte unter 2,5 und Viability-Werte von über 95% erreicht werden.

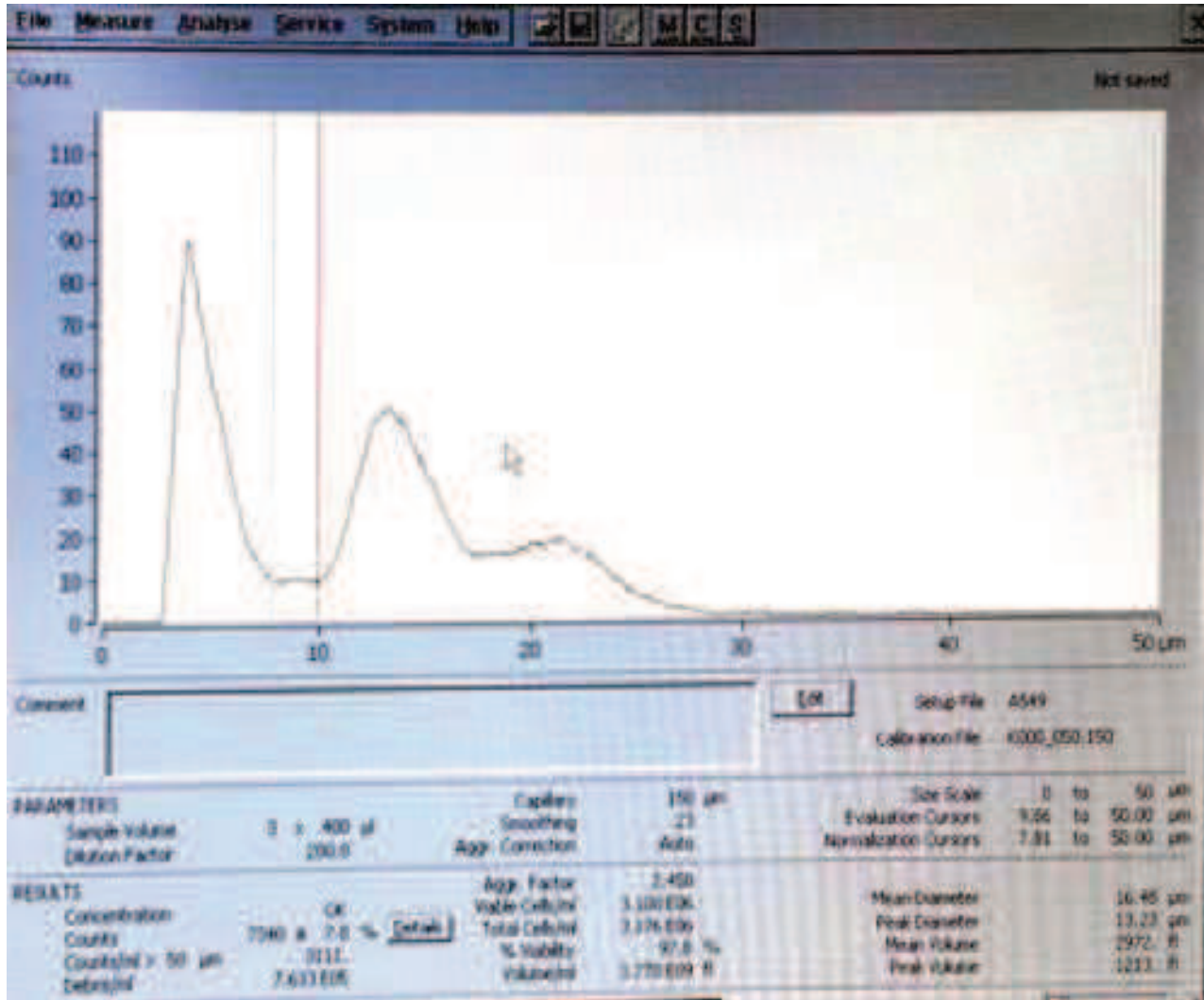


Abbildung 11. Anzahl gezählter Signale über die Größe aufgelöst (X-Achse).

Cutoffs: rot, schließt tote Zellen und grün schließt Zelltrümmer von der Zellzahlmessung aus. Eigenes Foto.

2.1.5 Zellstocks wegfrieren

Um eine Reserve des Zellstocks bei niedrigerer Passage zu sichern, wurden vor Beginn der Versuchsreihe Zellaliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden geerntet und nach Zentrifugation (300 rpm, 5 Min., RT) resuspendiert und zu $1,5 \times 10^6$ in 1 mL pro Cryotube mit 10% DMSO aliquotiert und im Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ Freezing Container langsam, – $1^\circ\text{C}/\text{Min.}$, auf -80°C gefroren. Am Folgetag konnten sie in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt werden. Durch langsames Einfrieren, hohe Zelldichte und DMSO wird die Bildung großer Eiskristalle verhindert, welche die Zellen zerstören würden.

2.1.6 Versuchsvorbereitung

Bei bekannter Zellkonzentration wurde je nach zeitlichem Versuchsablauf entsprechendes Volumen der Zellsuspension im DMEM/F12 Medium verdünnt. Um die Zellen in Kultur zu halten ohne die Passage unnötig zu erhöhen wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen bei Cisplatin-resistenten bzw. 1×10^6 bei parentalen A549 pro 75 cm^2 Zellkulturflasche nicht überschritten. Zur Zellvermehrung für Experimente wurde entsprechend des Bedarfes bei einer Zellverdoppelung in 24 h für parentale A549 bzw. 48 h für Cisplatin-resistente A549 zurück gerechnet und die nötigen Zellen weiter gezüchtet.

2.2 Transfektion mit siRNA

Für Transfektion mit siRNA und anschließende RNA Isolierung wurden 8×10^4 A549 Zellen in 1 mL Medium pro Well in 12-Well Platten ausplattiert, um nach 24 h eine 50%ige Konfluenz zu erreichen. Damit wurde die vom Hersteller geforderte Dichte erreicht um eine größtmögliche Exposition der Zelloberfläche mit dem Transfektionsreagenz zu gewährleisten. Verwendet wurde das Transfektionssystem „Jet Prime“ von Polyplus.

Pro Well wurde spezifische siRNA oder non-silencing RNA (Negativkontrolle) mit 100 µL Jet Prime Puffer auf die verwendete Konzentration gebracht, gevortext und gespinnt. Anschließend wurde das Jet Prime Reagenz dazupipettiert, 10 s gevortext, 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert und mit Pipette tropfenweise den Zellen zugefügt und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig im Medium verteilt. Nach verschiedenen Zeitpunkten (24, 48 und 72 h) wurden transfektierte Zellen für RNA- und Protein-Isolierung geerntet.

Zur Proteingewinnung wurden $1,6 \times 10^5$ Zellen in jeweils 2 mL in 6-Well-Platten ausplattiert, und die Transfektion wurde dem Volumen entsprechend angepasst. Nach 24 h wurden die Medien gewechselt, um potentielle toxische und unspezifische Effekte durch das Transfektionsreagenz auszuschließen.

2.3 RNA Analyse

Um die Expression eines Genes auf RNA Ebene analysieren zu können, waren mehrere Schritte nötig.

- RNA aus Zellen isolieren und aufreinigen
- RNA mit Hilfe von reverser Transkription in cDNA umschreiben, um sie amplifizieren zu können
- cDNA jeder Probe mit spezifischem Primer für Gen und Houskeeping Gen vergleichend in qPCR, quantitative Echtzeit PCR, analysieren

2.3.1 RNA Isolation und Aufarbeitung

Das Medium in den zu erntenden Wells wurde abgesaugt, die Zellen mit 1 mL 4°C kalter Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült um anschließend in 350 µL RNA Lysis Puffer des Kits lysiert zu werden. Das Zelllysat wurde mit der Pipette gesammelt und entweder gleich weiterbearbeitet oder kurzfristig bei -20 °C gelagert. Das Zelllysat wurde als erstes 1 Min. bei 12000 g durch eine „DNA Removing“ Säule zentrifugiert. Dann wurde der Durchfluss 1:1 mit 70%igem Ethanol vermischt und in der PerfectBind RNA Säule gebunden; dazu wird es 1 Min. bei 10000 g zentrifugiert. Die gebundene RNA wurde mit 500 µL Waschpuffer I und zwei Mal mit je

500 µl Waschpuffer II gewaschen, jeweils gefolgt von 15 s Zentrifugation bei 10000 g. Anschließend wurde die Säule 2 Min bei 10000 g trocken zentrifugiert (dieser Schritt ist notwendig um Ethanol-Reste ganz zu entfernen) um dann in 30 µL RNase-freiem H₂O, nach 3-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur, eluiert zu werden. Das Eluat wurde durch 1-minütige Zentrifugation bei 5000 g gesammelt und die gewonnene RNA bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Reverse Transkription

Vor dem Umschreiben der RNA Proben in cDNA wurde die Konzentration der RNA am Nanodrop Photometer durchgeführt. Vorteil der Methode ist der geringe Verbrauch an RNA pro Probe, 1 µl reicht zur Messung aus. Es wurde Optische Dichte (OD) bei zwei Wellenlängen vermessen, bei 260 und 280 nm. Aus der Extinktion der RNA Lösung lässt sich die Konzentration berechnen: OD₂₆₀ = 1 entspricht 40 µg/ml RNA. Die Ratio 260/280 lässt eventuelle Verunreinigungen durch Proteine erkennen, da der Absorptionsmaximum der Proteine bei 280 nm liegt. Ein Verhältnis von 2,0 spricht für eine reine RNA Isolierung, während ein Wert wesentlich kleiner als 2,0 für eine Verunreinigung der RNA mit Proteinen spricht.

Reverse Transkription 20.7.2015												
Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor	für 1000ng	H2O auf 15
1			101,2	ng/µl	2,529	1,191	2,12	1,93	RNA	40	9,9	5,1
2			91,7	ng/µl	2,291	1,072	2,14	1,82	RNA	40	10,9	4,1
3			120,5	ng/µl	3,012	1,415	2,13	0,94	RNA	40	8,3	6,7
4			90,4	ng/µl	2,261	1,057	2,14	0,85	RNA	40	11,1	3,9
5			119,9	ng/µl	2,998	1,412	2,12	1,66	RNA	40	8,3	6,7
6			105,7	ng/µl	2,641	1,247	2,12	1,57	RNA	40	9,5	5,5
7			112,3	ng/µl	2,808	1,323	2,12	1,42	RNA	40	8,9	6,1
8			111,8	ng/µl	2,794	1,311	2,13	2,22	RNA	40	8,9	6,1
9			155,9	ng/µl	3,897	1,84	2,12	1,87	RNA	40	6,4	8,6
10			151,7	ng/µl	3,793	1,798	2,11	2,35	RNA	40	6,6	8,4
11			139,5	ng/µl	3,489	1,649	2,12	1,59	RNA	40	7,2	7,8
12			169,9	ng/µl	4,248	2,026	2,1	1,79	RNA	40	5,9	9,1
13			180,5	ng/µl	4,511	2,146	2,1	1,57	RNA	40	5,5	9,5
14			192,9	ng/µl	4,823	2,302	2,09	1,68	RNA	40	5,2	9,8
15			213,6	ng/µl	5,34	2,543	2,1	1,42	RNA	40	4,7	10,3
16			200,9	ng/µl	5,023	2,384	2,11	1,59	RNA	40	5,0	10,0
17			213,7	ng/µl	5,343	2,551	2,09	2,04	RNA	40	4,7	10,3
18			205,7	ng/µl	5,141	2,451	2,1	1,49	RNA	40	4,9	10,1
19			143,5	ng/µl	3,588	1,693	2,12	1,77	RNA	40	7,0	8,0
20			176,9	ng/µl	4,422	2,095	2,11	2,1	RNA	40	5,7	9,3
21			279	ng/µl	6,974	3,343	2,09	0,46	RNA	40	3,6	11,4
22			232,5	ng/µl	5,813	2,783	2,09	2,13	RNA	40	4,3	10,7
23			201,3	ng/µl	5,032	2,396	2,1	0,64	RNA	40	5,0	10,0
24			182,5	ng/µl	4,563	2,18	2,09	1,51	RNA	40	5,5	9,5
25			242,3	ng/µl	6,058	2,886	2,1	2,29	RNA	40	4,1	10,9
26			218	ng/µl	5,45	2,585	2,11	1,76	RNA	40	4,6	10,4
27			289	ng/µl	7,224	3,479	2,08	1,47	RNA	40	3,5	11,5
28			258,5	ng/µl	6,463	3,094	2,09	2,18	RNA	40	3,9	11,1
29			219	ng/µl	5,475	2,596	2,11	1,68	RNA	40	4,6	10,4
30			245,9	ng/µl	6,148	2,931	2,1	2,3	RNA	40	4,1	10,9
31			182	ng/µl	4,551	2,146	2,12	1,66	RNA	40	5,5	9,5
32			156	ng/µl	3,9	1,825	2,14	1,29	RNA	40	6,4	8,6
33			445,7	ng/µl	11,142	5,463	2,04	2,03	RNA	40	2,2	12,8
34			501,6	ng/µl	12,541	6,271	2	1,85	RNA	40	2,0	13,0
35			421,7	ng/µl	10,543	5,173	2,04	2,12	RNA	40	2,4	12,6
36			405,8	ng/µl	10,145	4,954	2,05	1,83	RNA	40	2,5	12,5
37	25 RT-		242,3	ng/µl	6,058	2,886	2,1	2,29	RNA	40	4,1	11,9
38	kein Template											15
39	34 RT-		501,6	ng/µl	12,541	6,271	2	1,85	RNA	40	2,0	14,0
40	kein Template											15

Abbildung 12. Messwerten des Nanodrop Photometers. Gerätetemplate mit zugefügten Volumina der Proben und aqua dest. zur Konzentrationsnormierung in den rechten beiden Spalten. Rechte zwei Spalten mit Berechnung der Verdünnung für cDNA Synthese.

Für die cDNA-Synthesen wurde das Biorad iScript™ cDNA Synthesis Kit verwendet.

Zur Überprüfung der Reaktionsspezifität wurden Synthesereaktionen ohne RNA und ohne Reverse Transkriptase durchgeführt. Die cDNA-Synthese wurde im BioRad Cyclor unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 25°C für 5 Min., 42°C für 30 Min, 85°C für 5 Min., Abschluss bei 4°C. Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.3 qRT-PCR

Die PCR („polymerase chain reaction“ – Engl.) vermehrt vorhandene dann mit Hilfe von Enzym DNA-Polymerase. Die Doppelstränge werden zuerst bei 95°C thermisch gespalten bzw. denaturiert. Bei verringerter Temperatur (normalerweise zwischen 50-60°C, je nach Primer-Sequenz) können sich die spezifischen Primer anlagern. Es werden für jedes Zielgen sowohl „forward“ als auch „reverse“ Primer, um beide DNA Stränge synthetisieren zu können. Jeder PCR Ablauf muss in Abhängigkeit von Länge und Sequenz der verwendeten Primer optimiert werden, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Diese werden von Nukleotidpolymerasen erkannt. Sie lagern sich am Leitstrang an und verknüpfen die passenden freien Nukleotide zu einem komplementären Gegenstrang. Bei der quantitative real time PCR (qRT-PCR) wird die Menge der generierten DNA während der laufenden Cyclen über die Fluoreszenz von „SYBR Green“ gemessen - ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich während dem Extensionsschritt der PCR in den vorhandenen Doppelsträngen einlagert und fluoresziert.

Es wurde zunächst die cDNA mit RNase freiem H₂O entsprechend verdünnt (üblicherweise 1:10, also 2 µL auf 20 µL). Bei jedem Versuch wurden technische Duplikate gemacht, um eine größere Genauigkeit und bessere statistische Auswertung der Ergebnisse erreichen zu können.

Der Nachteil höherer Pipettierfehleranfälligkeit und späterer Fluoreszenzaufzeichnung der qRT-PCR bei geringerer Ausgangsmenge an cDNA wurde abgewogen, die Standardabweichung bei unterschiedlichen Konzentrationen verglichen und die beste Verdünnung bei $c = 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ der cDNA festgestellt.

Die verdünnte cDNA wurde mit einem Master Mix von 5 µL SYBR Green und 1 µL Primer Mix (1:10 Verdünnung von forward und reverse Primern) versetzt und als Duplikat à 4 µL in eine 384 Well Plate pipettiert (siehe Layout unten). Amplifiziert wurde mittels LightCycler 480 Real-time PCR Cycler (Roche Diagnostics, Wien, Österreich). Initiiert wurde bei 95°C 5 Min., anschließend wurden 40 Zyklen mit 10 s bei 95° und 30 s bei 60°C alternierend durchgeführt.

Exp. 07.07.2015 qPCR Sirt4 Thomas																											
Layout 384 well Platte																											
		24h								48h								72h									
		A549 NT		A549 NS		A549 40nm Sirt4		A549 80nm Sirt4		A549 NT		A549 NS		A549 40nm Sirt4		A549 80nm Sirt4		A549 NT		A549 NS		A549 40nm Sirt4		A549 80nm Sirt4			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
hSirt4	A	1	2	3	4					7	8	9	10					13	14	15	16					PAR	
hactβ	B																										PAR
hSirt4	C	1	2	3	4					7	8	9	10					13	14	15	16					CIS Res	
hactβ	D																										CIS Res
hSirt4	E	-RT	-RNA																								
hactβ	F																										Kontrolle
hHDAC11	G	1	2	5	6					7	8	11	12					13	14	17	18					PAR	
hactβ	H																										PAR
hHDAC11	I	1	2	5	6					7	8	11	12					13	14	17	18					CIS Res	
hactβ	J																										CIS Res
hHDAC11	K	-RT	-RNA																								
hactβ	L																										Kontrolle

Proben: Exp. KW 38/38 Thomas (A549PAR/CIS R siRNA Transf. 40/80nm 24/48/72h)
cDNA Konz.: 50 ng/µL --> 1:10 vorverdünnen (ges 20 µL sind ausreichend)

ges 26 Proben; dh 52 Dublikate --> 60x (inkl. Reserve)

Master Mix SIRT4/ActB	beta act	HDAC11/Sirt4
104 Proben + Reserve ->	120x	60x
2,5 µL Sybr Gr	300	150
0,5 µL Primer Mix 1:10	60	30

6 µL MM vorlegen
+ 4 µL cDNA
= 10 µL --> 4 µL/well

Abbildung 13. Layout für SIRT4 qRT-PCR Proben. Darunter Berechnung des Master Mix mit den entsprechenden Primern für SIRT4 und beta actin.

Die so gewonnenen Ct Werte (Ct = cycle threshold, Engl.) bezeichnen den Zeitpunkt der Überschreitung eines Schwellenwertes im Bereich linearer Zunahme der Fluoreszenzkurve. Sie erlauben die relative Quantifizierung im Vergleich mit konstant ausgeprägten, durch die Silencing Behandlung nicht deregulierten sogenannten Houskeeping Genen.

Da die DNA-Menge und damit die SYBR-Green vermittelte Fluoreszenz in jedem Zyklus verdoppelt wird, kann auf die Ausgangsmenge rückgeschlossen werden. Dazu wird die Expression der Ziel-RNA über die RNA des Houskeeping Gens normalisiert (Ct Wert für das Housekeeping-Gen minus Ct Wert fürs Ziel-Gen = normalisierter Ct Wert). Anschließend kann die Genexpression relativ verglichen werden, wobei ein späteres Überschreiten des Schwellenwertes eine geringe Ausgangsmenge anzeigt – ein Zyklus = $\frac{1}{2}$, zwei Zyklen = $\frac{1}{4}$, usf. Wir verwendeten als Housekeeping Gen β -Aktin, das sich in allen Proben als stabil exprimiert zeigte.

Die Schmelzpunktkurve wurde im Bereich von 70°C bis 95°C mit 0,1°C/s Steigung aufgezeichnet, unspezifische Bindungen von Primern oder Abbruchstücke würden in der Schmelzkurve als aberranter Abfall der Fluoreszenz, also anderer Schmelztemperatur, ersichtlich.

1.3.4 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet. Für jeden Versuch wurden aus drei unabhängigen biologischen Durchführungen mit technischen Duplikaten in der qRT-PCR Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet.

2.4 Proteinanalyse

2.4.1 Proteinernte und Isolierung

Ziel dieser Methode ist die vollständige Auflösung der Zelle um sämtliche Zellproteine zu gewinnen.

Die Zellen wurden in den Wells mit 4°C PBS gewaschen und anschließend mit RadioImmunoPräzipitationsAssay (RIPA) Puffer lysiert. Am ersten Zeitpunkt (24 h nach Transfektion) bei geringerer Zellzahl wurden 100 bis 150 µL RIPA Puffer verwendet, um ausreichende Konzentration für die Gelelektrophorese zu gewinnen, da die Geltaschen nur begrenztes Volumen aufnehmen. Bei späteren Zeitpunkten (48 und 72 h nach Transfektion) wurden die Zellen in 300 µL RIPA Puffer lysiert. Nach Zugabe von RIPA Puffer wurde der Bodensatz mit einem Scraper gelöst und mitgeerntet. Die niedrige Temperatur, jede weitere Verarbeitung erfolgte auf Eis, und die Verwendung des Proteaseinhibitors Complete von Sigma Aldrich verhinderten den enzymatischen Abbau der geernteten Proteine. Um die Zelllyse weiter zu verbessern, wurden die Proben mit Ultraschall behandelt bei 4 x 0,8 Cycle und 80% Amplitude.



Abbildung 14. Ultraschallprozessor (UP50H Fa Hielscher, BRD). Eigenes Foto.

Nach Ultraschallbehandlung wurden Zelllysate abzentrifugiert (10 Min bei 13000 U/min und 4°C) um die unlösliche Proteinfraction zu entfernen. Überstände mit löslichen Proteinen wurden weiterbearbeitet oder bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Westernblot/Immunoblot

Western- oder Immunoblotting ist seit seiner Einführung eine Routinetechnik zur Proteinanalyse. Eine Proteinmischung wird elektrophoretisch größenabhängig im Polyacrylamid Gel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Es werden Antikörper verwendet um ein spezifisches Protein zu finden und qualitative und semi-quantitative Daten zu gewinnen (55).

2.4.3 Vorbereitung der Elektrophoresegele

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine unterschiedlicher Größe wurden PAGE, Polyacrylamid Gel Elektrophorese Gele gemäß Laemmli Methode (56) verwendet. Das Gel entsteht durch die Polymerisation von Acrylamid:Bisacrylamid mit Hilfe des Katalysators N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS). Die beste Auflösung im Größenbereich von 39 kDa, der Größe von SIRT4, zeigte sich bei 12%igen Gelen.

Die Lösung für das 12%ige Trenngel wurde durch Mischung von 8 mL 30%iger Acrylamid:Bisacrylamid Lösung, 5,2 mL alkalischem Trennpuffer (pH = 8,8), 6,4 mL aqua dest., 200 mL SDS (10%ige Lösung), 8 µL TEMED und 200 µL APS hergestellt und in zwei Bio Rad Matrizen mit 1,5 mm Geldicke gegossen. Die Überschichtung des Gels mit 70% Ethanol brachte eine luftblasenfreie gerade obere Gelgrenze. Nach der Polymerisation (ca. 30 Min.) wurde der Ethanol abgegossen und Rückstände mit Filterpapier entfernt. Anschließend wurde die 4,5%ige Sammelgellösung aus 1 mL 30%ige Acrylamid:Bisacrylamid Lösung, 0,75 mL neutralem Sammelpuffer (pH = 6,8), 4,1 mL aqua dest., 60 mL SDS, 60 µL TEMED, 60 µL APS und 60 µL Bromphenolblau (BPB) zur Markierung der Probenaschen gemischt und auf das Trenngel

gegossen. Mittels eingefügten Kamms wurde das Gel mit 10 Taschen versehen um 20 µg Gesamtprotein in max. 50 µL Endvolumen laden zu können.

2.4.4 Proteinmengenbestimmung und -normierung

Um die Menge des zu detektierenden Proteins unterschiedlicher Proben, vor allem unterschiedlicher Zeitpunkte mit durch die weiter vorangeschrittene Zellvermehrung ansteigenden Gesamtproteingehalt, vergleichen zu können, müssen die Proteinkonzentrationen in geernteten Proben bestimmt und durch unterschiedliche Verdünnungen normiert werden.

Der BCA, Bichinon Acid Assay, eine Methode zur Proteinmengenbestimmung beruht auf Kolorimetrie. Durch vorhandene Peptidbindungen der Proteine werden Kupfer Ionen reduziert die darauf eine Komplexbindung mit Bicinchoninsäure eingehen. Die Intensität des Farbkomplexes ist proportional zur Proteinkonzentration und kann photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm bestimmt werden. In doppeltem Ansatz wurden 5 µL der zu bestimmenden Proteinproben mit 20 µL RIPA Puffer 1:5 in einer 96 Well-Platte verdünnt. Jedem Well wurden 200 µL BCA Lösung (Thermo Fisher Scientific) mit Kupfersulfat 1:50 zugefügt. Für Standardreihe wurde bovines Serumalbumin in bekannter Konzentration von 1 mg/mL verwendet und in einer 1:2 Verdünnungsreihe plus Leerwert, Wells ohne Proteinzusatz um die Grundabsorption von Küvette und Lösung zu subtrahieren, eingefügt. Nach 30 Min. Inkubation bei 37°C wurden die Proben photometrisch mit Spectra Max (Molecular Devices) Fotometer ausgewertet.

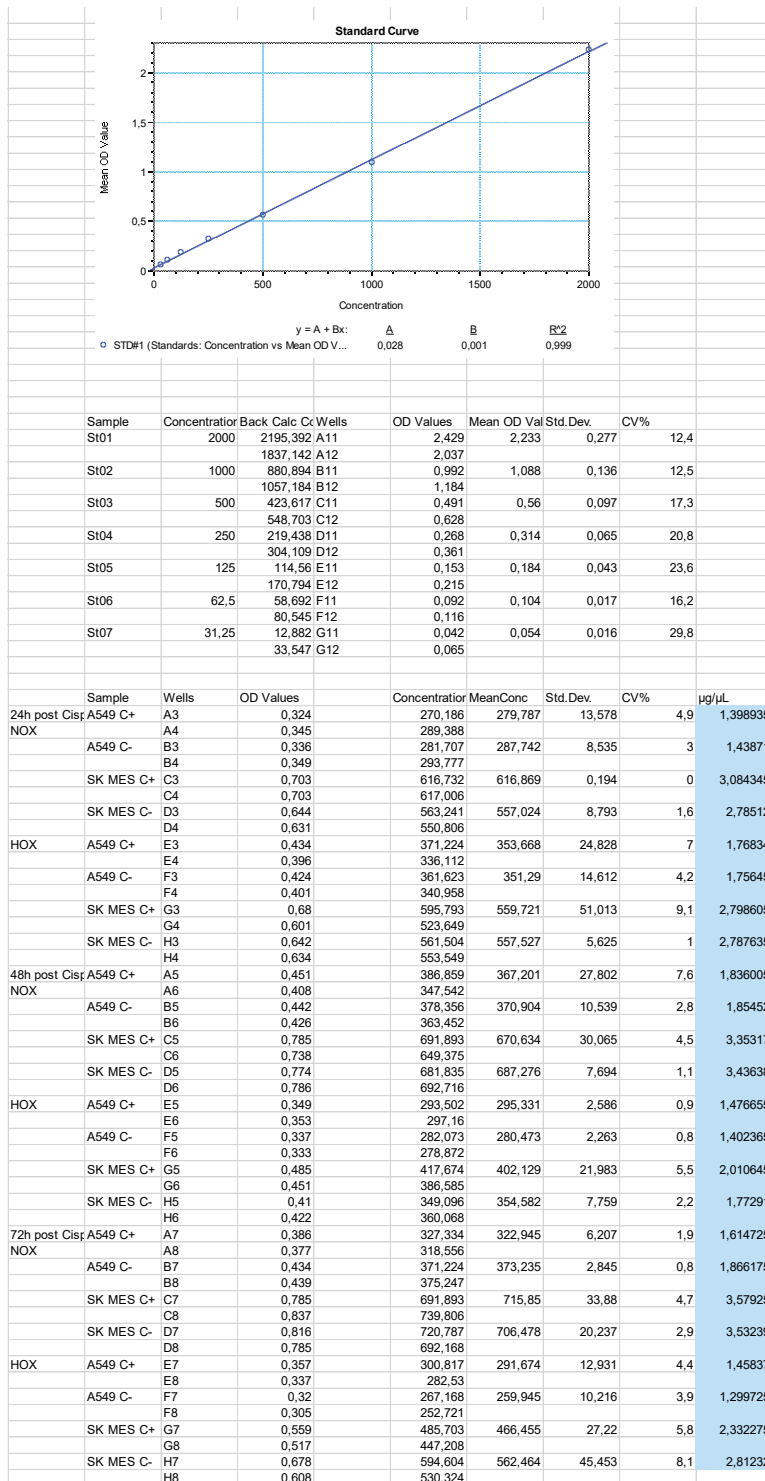


Abbildung 15. Konzentration der Proben, Messung mit Spectra Max Fotometer.

Die Standardkurve mit Standardabweichung einzelner Werte zeigt Ausreißer um Fehler der Regressionsgeraden zu erkennen. Darunter Tabelle der Absorptionen und den daraus errechneten Konzentrationen mit Standardabweichungen im Doppelansatz.

2.4.5 Probenvorbereitung

Um dem verwendeten Antikörper die Erkennung der Primärstruktursequenz zu ermöglichen muss zunächst die Dreidimensionale Struktur des Proteins aufgelöst, denaturiert werden. Dazu wurden die Proben mit 5x Lämmli Puffer versetzt und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Das im Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol spaltet Disulphidbrücken, das SDS versieht die Proteine mit einer einheitlich negativen Ladung, sodass die Auftrennung der Größe nach erfolgt. Eine erneute Aggregation langer, denaturierter Proteine wird dadurch auch verhindert. Das im Lämmli Puffer enthaltene Glycerol erhöht die Dichte und hält die Proteinprobe in der Ladetasche. Bromphenolblau migriert als kleiner anionischer Farbstoff am schnellsten und macht die wandernde Front im Gel sichtbar.

2.4.6 Laden des Gels

Jeweils zwei PAGE-Gele wurden in einer Halterung im Elektrophoresetank fixiert, der Tank wurde mit 4°C gekühltem Elektrophorese-Puffer (0.025 M Tris pH 8.3, 0.192 M Glycin, 0.1 % SDS) gefüllt. Geladen wurden Proben mit Pipette oder Hamilton-Spritze. Eine Geltasche wurde mit Proteinmarker peqGOLD IV (Peqlab) bestückt, der farbmarkierte Proteine bekannter Größe enthält und damit die Lage der Zielproteine im Gel und später auf der Membran anzeigt. Das ermöglicht außerdem eine Beschneidung der Membran auf die Zielgröße, um Antikörper und Filme zu sparen.



Abbildung 16. Proteinproben in Sammelgeltaschen auf einem Polyacrilamid Gel. Eigenes Foto.
Die Proteinproben, durch Bromphenolblau dunkelblau gefärbt, befinden sich am Boden der hellblau gefärbten Sammelgeltaschen. Der Proteinmarker in der Geltasche ganz rechts.

2.4.7 Elektrophorese

Durch die Halterung und die Glasmatrix der Gele entsteht eine Innere Kammer die mit der oberen Seite der Gele über den Elektrophoresepuffer in Verbindung steht und in die die Kathode eingefügt ist. Die Unterkante der Gele endet in der äußeren Kammer, die die Anode enthält. Daher wandern die negativ geladenen Proteine im Gel von der Anode angezogen nach unten. Durch den Widerstand des Gels wandern kleine Proteine schneller, größere langsamer und

werden der Größe nach geordnet. Die Auftrennung der Proteine nach Größe erfolgte im elektrischen Feld bei 180 V für ca. 1 h. Die Front wurde durch Bromphenolblau monitorisiert, das als kleines Farbstoffmolekül den Proteinen vorausseilt. Damit kann man verhindern dass Proteine aus dem Gel in den Tank wandern und zur Analyse verloren gehen.

2.4.8 Tank Transfer (Wet Electroblothing)

Um die Antigene für die Antikörper zu präsentieren, werden die Proteine aus dem Gel auf eine proteinbindende Membran aus entweder Nitrozellulose (NC) oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) transferiert. In unserem Fall wurde Nitrocellulose Membran mit 0,45 µm Porengröße verwendet. Die negativ geladenen Proteine werden im elektrischen Feld zur hinter der Membran platzierten Anode gezogen und setzen sich auf der Membran ab. Beim verwendeten High Field Transfer reduziert die hohe Stromstärke die Transferdauer, allerdings muss ein Übertransfer oder Blowout verhindert werden der vor allem bei kleinen Proteinen oder großporigen Membranen auftreten kann.

Für Proteine von 14 bis 116 kDa wird eine 80-100%ige Transfereffizienz (Herstellerangabe) erreicht. Die Gele wurden auf der mit Transferpuffer (0,56 g Tris, 2,86 g Glycin, ad 200 ml A.d.) getränkten Membran positioniert und mit Filterpapier und Transferschwämmen verkleidet in der Sandwichhalterung platziert. Es wurde ein Strom von 400 mA für 1,5 h angelegt. Der Transfer wurde entweder im Kühlraum oder auf Eis durchgeführt und der Transferpuffer durch Magnetrührer durchmischt, um die entstehende Wärme abzuleiten und bessere Bandenschärfe zu erhalten.

Abbildung 17 verdeutlicht den Aufbau des Transfertanks mit eingefügter Halterung für Gel und Transfermembran.

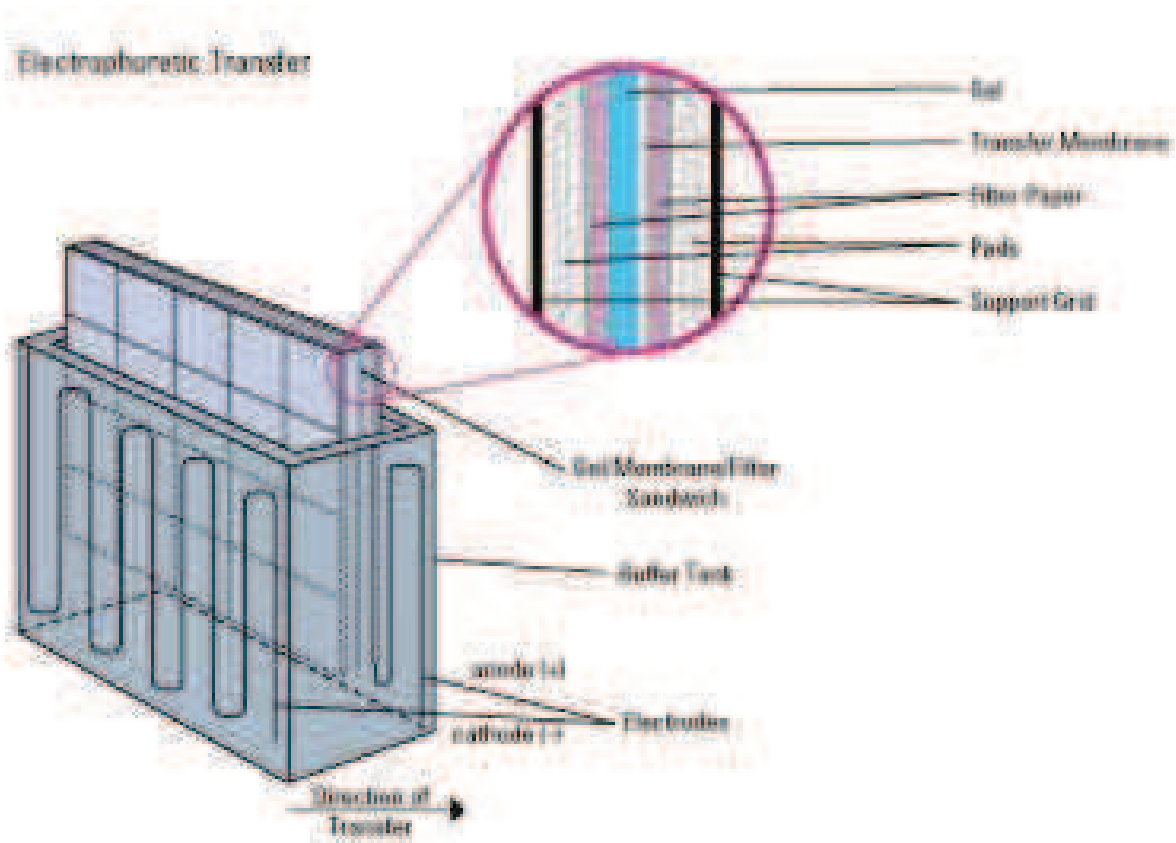


Abbildung. 17. Schema des Tank Transfers. Übernommen von <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/western-blot-transfer-methods.html>

Nach dem Transfer wurde der Erfolg mithilfe einer Ponceau S Rot Färbung verifiziert. Ponceau S verändert die Proteinstruktur nicht und ist leicht wieder mit Wasser zu entfernen. Diese Proteinfärbung hilft Fehler und Artefakte früh zu erkennen und macht Korrekturen der Membrangröße möglich.

2.4.9 Blockierung

Die freien Bindestellen der Membran müssen gesättigt werden um unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Möglich ist das grundsätzlich mit den Proteinen in Milchpulver oder mit bovinem Serumalbumin (BSA), welche in Tris gepufferter Salzlösung mit Tween20 Detergent (10x TBST Puffer: 1% Tween 20, 1.5 M NaCl, 500 mM Tris.HCl, pH7.4) gelöst werden. Diese Blockierung verbessert das Signal zu Hintergrund Verhältnis. Welcher Block am effektivsten funktioniert ist abhängig von Antigen und Antikörper. Verwendet wurde eine jeweils 5%ige Lösung von fettfreiem Milchpulver oder BSA (in TBST). Die Membranen wurden in ca. 40 mL pro Membran 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt.

2.4.10 Antikörperinkubation

Die Inkubation mit dem spezifischen ersten Antikörper erfolgte in 5%iger Milch- bzw. BSA-TBST Lösung. Erstantikörper wurde entsprechend verdünnt, mit Membran in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C über Nacht auf einem Drehrad inkubiert. Durch Verwendung des Erstantikörpers in der Blockierungslösung wird der Block stabilisiert und der Hintergrund verringert, eine konstante Bewegung verhindert Konzentrationsunterschiede der Antikörperlösung, der Detergent Tween20 minimiert unspezifische Antikörperbindungen und erhöht damit die Spezifität.

2.4.11 Immundetektion

Zur Detektion wurde die sehr sensitive Chemilumineszenz Methode genutzt (Abbildung 18). Die indirekte Bindung mit einem Zweitantikörper führt zur Verstärkung des Signals und lässt die Bindungsfähigkeit des Erstantikörpers unbeeinträchtigt. Der Zweitantikörper ist mit Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase, Engl.) markiert. Die Markierung kann nun mit einem Enhanced Chemilumineszenz Kit (ECL Kit), ausgewertet werden. Das Kit enthält Luminol und 3-Aminophthalsäurehydrazid in Natronlauge, damit als Dianion. Es wird kurz vor

Anwendung mit Wasserstoffperoxid Lösung gemischt. Von der Meerrettichperoxidase oxidiert entsteht ein instabiles Intermediat, das über angeregte Zwischenzustände beim Rückfall in den Grundzustand Licht emittiert. Wenn dem Kit modifizierte Phenole zugefügt sind erhöhen diese Lichtintensität und Dauer der Reaktion, das Kit ist "enhanced" und erlaubt die Detektion bereits bei Proteinmengen von 1-10 pg (57).

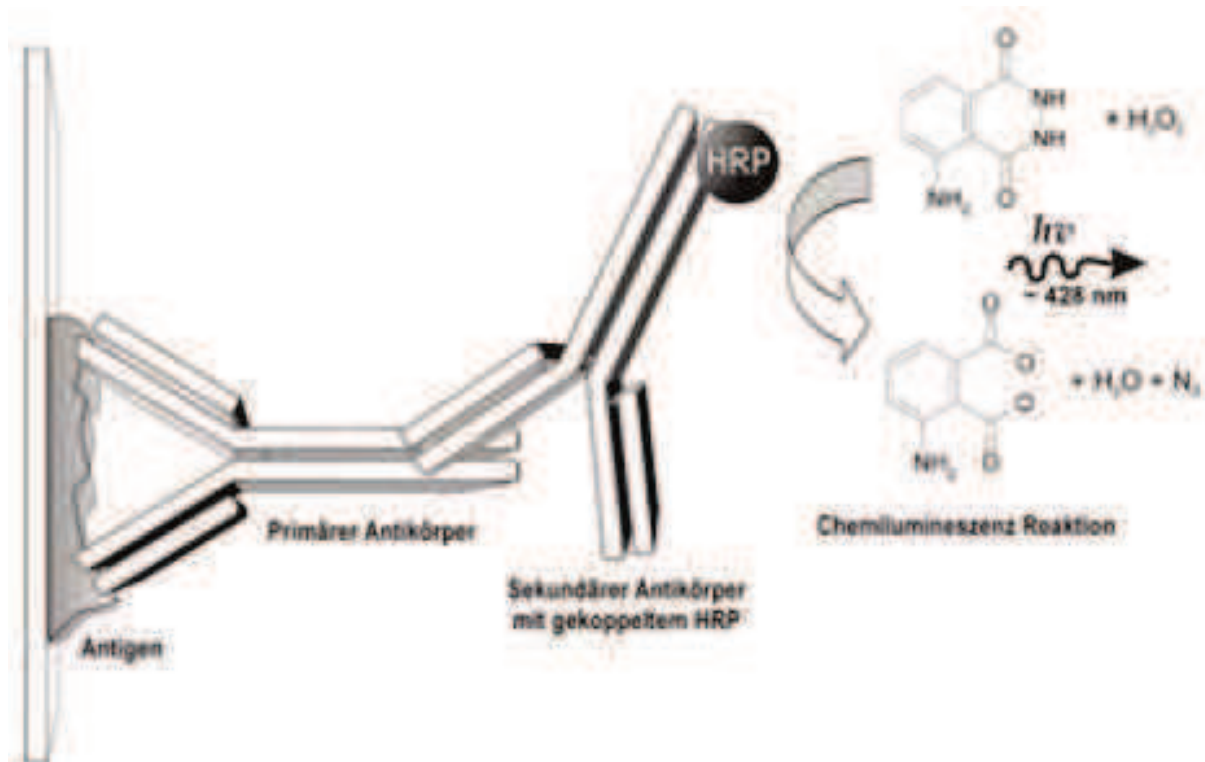


Abbildung. 18. Schema der Immundetektion. Übernommen von https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/99/Schema_der_Immundetektion.jpg

Nach drei Waschschrinen mit TBST (3x15 Min) wurde der Zweitantikörperbesatz mit dem ECL Kit Pico von Thermo Fisher durch Chemolumineszenz detektiert. Zwei Lösungen aus diesem Kit wurden 1:1 gemischt und anschließend 1,5 mL Fertiglösung pro Membran aufgetragen. Nach 5 Min vor Licht geschützter Inkubation wurde der Überstand von der Membran entfernt. Die Reaktion hält an solange Wasserstoffperoxid vorhanden und die HRP aktiv ist, je nach Ansatz Minuten bis Stunden.

Wir verwendeten Röntgenfilme, um die Chemiluminiszenzsignale zu detektieren. Die Membran wurde unter Kunststoffolie in eine Entwicklungskassette gegeben und in Dunkelkammer wurden Röntgenfilme draufgelegt. Es ist dabei wichtig, die der Signalstärke entsprechende Belichtungszeit zu finden. Diese muss lang genug sein um für die Auswertung ausreichend starke Signale detektieren zu können. Bei zu langer Belichtungszeit wird der Film überbelichtet, die Signalintensität übersteigt die Darstellungsmöglichkeit des Films und weitere Signale gehen für die Auswertung verloren. Außerdem steigt das Signal/Hintergrund Verhältnis. Zur Entwicklung der Filme wurde eine Filmentwicklermaschine von AGFA genutzt. Die Filme wurden mit Bio Rad Chemi Doc eingescannt, mit Hilfe der Gerätesoftware Image Lab ließen sich die Signale auf dem Film auswerten und semiquantitativ die Proteinmengen der Proben bestimmen.

Während dieses Projektes wurde im Labor die ChemiDocTouch Kamera (Biorad) eingeführt. Sie nimmt direkt die Chemilumineszenz auf, die Entwicklung und das Einscannen der Filme entfallen damit.

2.4.12 Proteinladekontrolle

Ziel des Immunoblots ist die relative Ausprägung des Zielproteins im Verhältnis zum Gesamtprotein zu erhalten. Damit lassen sich Proben zu verschiedenen Zeitpunkten auch unterschiedlicher Zelllinien vergleichen. Da das Housekeeping Protein β -Aktin stabil exprimiert war wurde es zur Normierung verwendet. Nach dem Immunoblotting für SIRT4 wurden Membranen 2x5 Min in TBST gewaschen um ECL-Kit Rückstände zu entfernen und anschließend 10 Min. in Restore Plus Western Blot stripping buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) geschwenkt. Diese entfernt sämtliche gebundenen Antikörper von den membrangebundenen Proteinen. Nach zwei weiteren Waschschrinen im PBS für 2x5 Min. wurde 1 h in 5% Milch-TBST blockiert, über Nacht bei 4°C mit β -Aktin Antikörper (1:5000 in MTBST) inkubiert und 3x10 Min. in TBST gewaschen. Anschließend wurden Membranen mit Zweitantikörper, anti-Maus, 1:10000 verdünnt in TBST für 1h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3x15min in TBST wurde wieder mit West Pico ECL Kit entwickelt.

2.4.13 Densitometrische Auswertung

Mit Hilfe des von BioRad mitgelieferten Programms ImageLab konnten die aufgezeichneten Signale ausgewertet werden. In den Aufnahmen der ECL-Reaktionen werden die Banden der gesuchten Proteine markiert. Das Programm addiert sämtliche gemessenen Signale innerhalb dieser Markierungen auf, es wird der überall aufgezeichnete Hintergrund subtrahiert. Die entstehenden Werte wurden durch die Messwerte der β -Aktin Ladekontrolle zueinander ins Verhältnis gesetzt und erlaubten eine semiquantitative Auswertung der Immunoblots.

2.5 Materialliste

2.5.1 Zellkultur

Medium Dulbecco's Modified Eagle Medium:

Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) +	Gibco, Paisley, UK
10 % fetalem Rinderserum (FBS) Biowest,	Nuaillé, France
1 % Glutamin L-Glutamine 200mM Gibco,	Gibco, Paisley, UK
1% Pennicillin und Streptomycin	Gibco, Paisley, UK
Cisplatin	Apotheke LKH Graz
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich, Wien, Österreich
75cm ² Kulturflaschen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEM/F12	Gibco, Paisley, UK
Inkubator	Binder, Tuttlingen, BRD
Sicherheitswerkbank, Klasse 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin-EDTA 0.25%	Gibco, Paisley, UK
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4	Apotheke LKH Graz
Cryo.S, PP, with screw cap	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NaCl Lösung	Roth, Karlsruhe
Phasenkontrastmikroskop ZEISS Axiovert 200M	Zeiss, Jena, BRD
Zentrifuge Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, BRD
Casy Zellzähler, Casy Tone Zellmedium	OLS, Bremen, BRD
Platten	
12-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
6-Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.5.2 Transfektion

Jet Prime® kit	Polyplus-transfection, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
siRNA	
SIRT4 sc-63024	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
HDAC11 sc-156104	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

2.5.3 RNA Analyse

Peqlab gold kit	VWR, Radnor, USA
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad Industries, Hercules, USA
Nanodrop Photometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cycler	BioRad Industries, Hercules, USA
PCR 384Well Platte	Roche Austria, Wien, Österreich
Sybr Green	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
LightCycler 480 Real-time PCR Cycler	Roche Austria, Wien, Österreich

2.5.4 Proteinanalyse

RIPA Puffer	Sigma Aldrich, Wien, Österreich
Scraper	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteaseinhibitor-Cocktail cOmplete	Sigma Aldrich, Wien, Österreich
Ultraschallprozessor UP50H Fa	Hielscher, Teltow, BRD

2.5.4.1.1 BCA

Bicinchononic Acid Assay Kit	Novagen, Wisconsin, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, BRD
96 Well-Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spectra Max Photometer	Molecular Devices, Silicon Valley, USA

2.5.4.2 Elektrophorese

Tank, Halterung, Kamm, Matriz	BioRad, Hercules, USA
-------------------------------	-----------------------

2.5.4.2.1 PAGE

Acrylamide 30%	Merck, Darmstadt, BRD
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Wien, Österreich
Ammoniumpersulfat APS	Sigma Aldrich, Wien, Österreich

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma Aldrich, Wien, Österreich
Ethanol	Merck, Darmstadt, BRD
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Wien, Österreich
β-mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Wien, Österreich
Proteinmarker: peqGOLD IV	VWR, Radnor, USA

2.5.4.3 Tank Transfer

Transfermembran, Nitrocellulose	GE Healthcare, Little Chalfont, GBR
Transfermembran, PVDF	GE Healthcare, Little Chalfont, GBR

2.5.4.3.1 Transferpuffer

Trizma base	Sigma Aldrich, Wien, Österreich
Trizma HCl	Sigma Aldrich, Wien, Österreich
Ponceau-S Färbelösung	Merck, Darmstadt, BRD

2.5.4.4 Blockierung

Milchlösung 5%	Roth, Karlsruhe, BRD
BSA Lösung 5%	Roth, Karlsruhe, BRD
Tween	Sigma Aldrich, Wien, Österreich

2.5.4.5 Antikörperinkubation

2.5.4.5.1 AK1

SIRT4

(H-234): sc-135053	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
SAB2500946	Sigma Aldrich, Wien, Österreich

HDAC11

PA5-11250	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EPR11342	Abcam, Cambridge, UK

2.5.4.6 Chemilumineszenz

ECL Kit SuperSignal™ West Pico

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Hyperfilm ECL chemiluminescence film

GE Healthcare, Little Chalfont, GBR

Bio Rad Chemi Doc

BioRad, Hercules, USA

2.5.4.7 Ladekontrolle

Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.5.4.7.1 AK 1

β-actin 47778

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

3 Ergebnisse

3.1 Silencing Effekte mit SIRT4 und HDAC11 siRNA: Optimierung von Transfektionsreagenz und siRNA Konzentration

Die Wirkung der Silencing Behandlung wurde zunächst auf RNA Ebene durch qRT-PCR nachvollzogen. Mit laborüblichen siRNA-Konzentrationen von 20 bzw. 50 nM konnten nach Transfektion mit JetPrime folgende Effekte auf RNA Ebene im Vergleich zu NS Proben bei Cisplatin-resistenten A549 Zellen erzielt werden.

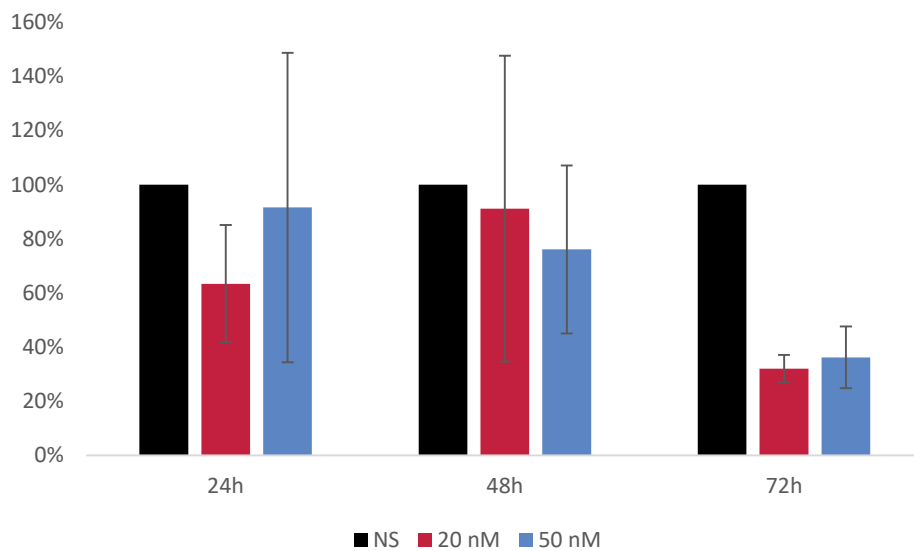


Abbildung 19. Expression von SIRT4 in Cisplatin-resistenten A549 Zellen nach siRNA Transfektion mit JetPrime.

Es wurden 8×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert, 24 h inkubiert und anschließend wurde die Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen (20 und 50 nM) von SIRT4-siRNA und 50 nM NS-siRNA (Kontrolle) durchgeführt. Die ersten Proben wurden nach 24 h geerntet, bei restlichen wurde das Medium gewechselt. Weitere Ernten folgten 48 h und 72 h nach Transfektion. Es werden Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt. Die qRT-PCR wurde jeweils im Duplikat durchgeführt.

SIRT4 Expression konnte nach 72 h bis auf 32% der Ausgangsexpression verringert werden (knock-down Effekte von 68%). Eine höhere Konzentration (50 nM) brachte keine weitere Steigerung des

knock-down Effekts. Bei den früheren Zeitpunkten war kein stabiler knock-down Effekt zu erkennen.

3.1.1 A549, Cisplatin-resistent: HDAC11 Silencing, JetPrime, 20 nM / 50 nM

Silencing Effekte mit HDAC11 siRNA: Optimierung von Transfektionsreagenz und siRNA Konzentration

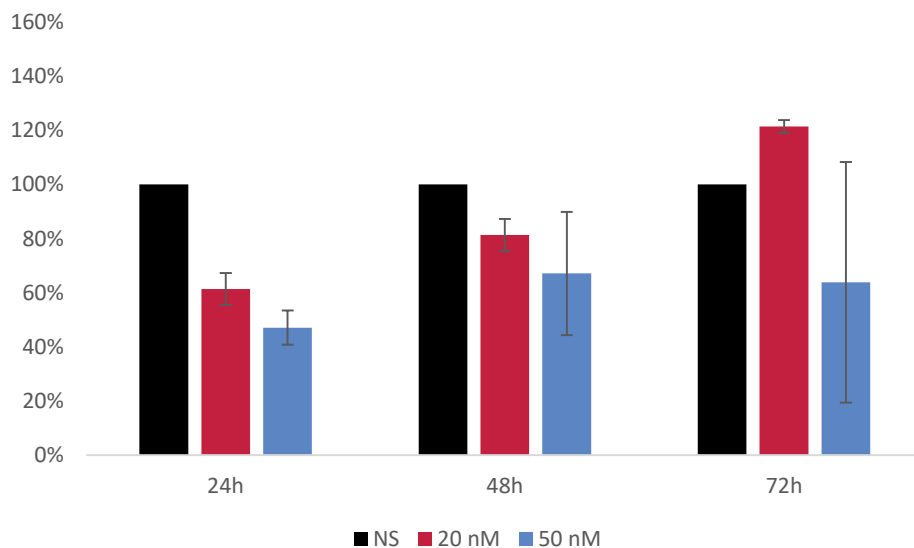


Abbildung 20. Expression von HDAC 11 in Cisplatin-resistenten A549 Zellen nach siRNA Transfektion mit JetPrime.

Es wurden 8×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert, 24 h inkubiert und anschließend wurde die Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen (20 und 50 nM) von HDAC11-siRNA und 50 nM NS-siRNA (Kontrolle) durchgeführt. Die ersten Proben wurden nach 24 h geerntet, bei restlichen wurde das Medium gewechselt. Weitere Ernten folgten 48 h und 72 h nach Transfektion. Schaubild zeigt die Expression von HDAC11 in Cisplatin-resistenten A549 Zellen nach unterschiedlicher Behandlung. HDAC11 siRNA in Konzentrationen 20 nM und 50 nM im Vergleich zur Kontrolle - Zellen behandelt mit Non-Silencing RNA (NS). Es werden Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt. Die qRT-PCR wurde jeweils im Duplikat durchgeführt.

Bei den HDAC11 Silencing Versuchen wurde folgende Reduktion der HDAC11 Expression nach 24 h festgestellt; 61% Reduktion mit 20 nM siRNA und 47% Reduktion mit 50 nM siRNA. Diese Werte wurden im Vergleich zur Expression von HDAC11 in NS-RNA-behandelten Zellen (Kontroll-Zellen) berechnet. Die knock-down Effekte waren geringer 48 h nach Transfektion und ganz inkonsistent nach 72 h. Mit 50 nM siRNA konnten nach 48 h 67% und nach 72 h 64% der Ausgangsexpression von HDAC11 festgestellt werden. Die große Standardabweichung von 0,23 bei 48 h und 0,44 bei der Untersuchung nach 72 h ließen keine eindeutige Aussage zu.

3.1.2 SK-MES, cisplatin-resistent: Sirt4 Silencing, JetPrime, 20 nM / 50 nM

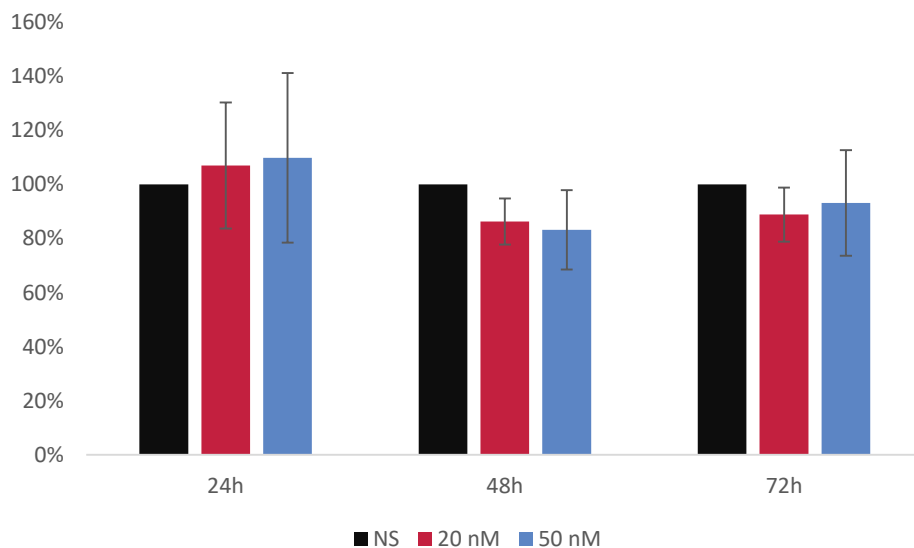


Abbildung. 21. Expression von SIRT4 in Cisplatin-resistenten SK-MES Zellen nach siRNA Transfektion mit JetPrime.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert, 24 h inkubiert und anschließend wurde die Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen (20 und 50 nM) von HDAC11-siRNA und 50 nM NS-siRNA (Kontrolle) durchgeführt. Die ersten Proben wurden nach 24 h geerntet, bei restlichen wurde das Medium gewechselt. Weitere Ernten folgten 48 h und 72 h nach Transfektion. Das Diagramm zeigt die Expression von SIRT4 in Cisplatin-resistenten SK-MES Zellen nach unterschiedlicher Behandlung: siRNA in Konzentrationen 20 nM und 50 nM im Vergleich zur Kontrolle - gleiche Zellen mit Non-Silencing RNA (NS) transfiziert. Es werden Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt. Die qRT-PCR wurde jeweils im Duplikat durchgeführt.

In SK-MES Zellen zeigte sich bei keinem Zeitpunkt eine signifikante Änderung der SIRT4 Expression.

3.1.3 SK-MES, Cisplatin-resistent: HDAC11 Silencing, JetPrime, 20 nM / 50 nM

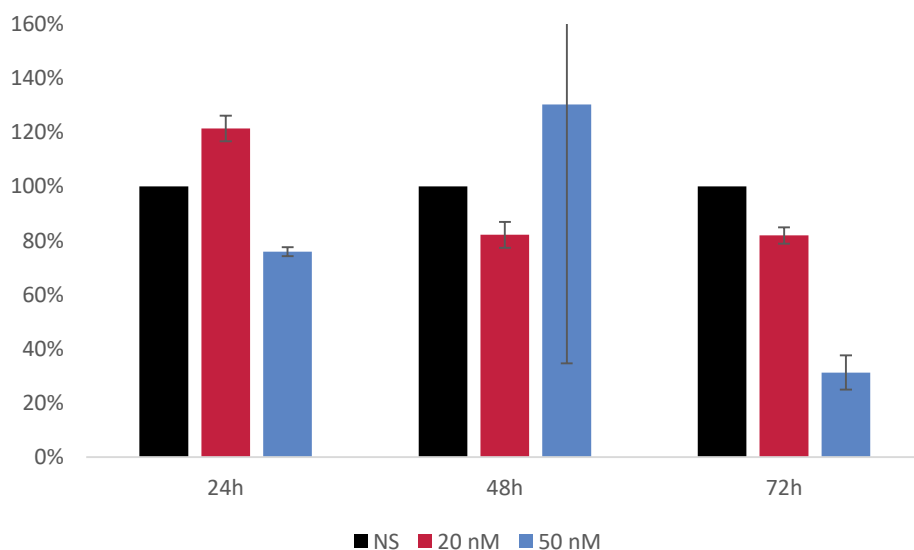


Abbildung 22. Expression von HDAC 11 in Cisplatin-resistenten SK-MES Zellen nach siRNA Transfektion mit JetPrime.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert, 24 h inkubiert und anschließend wurde die Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen (20 und 50 nM) von HDAC11-siRNA und 50 nM NS-siRNA (Kontrolle) durchgeführt. Die ersten Proben wurden nach 24 h geerntet, bei restlichen wurde das Medium gewechselt. Weitere Ernten folgten 48 h und 72 h nach Transfektion. Das Diagramm zeigt die Expression von HDAC11 in Cisplatin-resistenten SK-MES Zellen nach unterschiedlicher Behandlung: siRNA in Konzentrationen 20 nM und 50 nM im Vergleich zur Kontrolle - gleiche Zellen mit Non-Silencing RNA (NS) behandelt. Es werden Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen und dazugehörige Standardabweichung gezeigt. Die qRT-PCR wurde jeweils im Duplikat durchgeführt.

HDAC11-transfizierte Zellen zeigten 24h nach Transfektion mit 20 nM siRNA eine leicht erhöhte Expression, nach 48h und 72h eine konstante Verringerung auf 82% der Ausgangsexpression in Kontrollzellen (transfiziert mit NS-RNA).

Nach Transfektion mit 50 nM siRNA konnte nach 24h 76% der Ausgangsexpression gezeigt werden. Expressionsrate von HDAC11 nach 48h war leicht erhöht, allerdings konnten wir in den einzelnen Versuchen stark Schwankungen beobachten weswegen keine Aussage möglich ist. Die besten knock-down Effekte (68% knock-down) wurden bei 50 nM siRNA nach 72h beobachtet.

Dies war der einzige brauchbare knock-down Effekt der in den SK-MES Zellen beobachtet werden konnte. Eine Transfektion mit vorhandenem Jet Prime Reaktionsreagenz und siRNA bei SK-MES Zellen schien fruchtlos. Es wurde weiteres Effektivere als Transfektionsreagenz bei SK-MES Zellen in einem einzelnen Versuch getestet.

3.1.4 Testung von Effektene Transfektionsreagenz in SK-MES Zellen

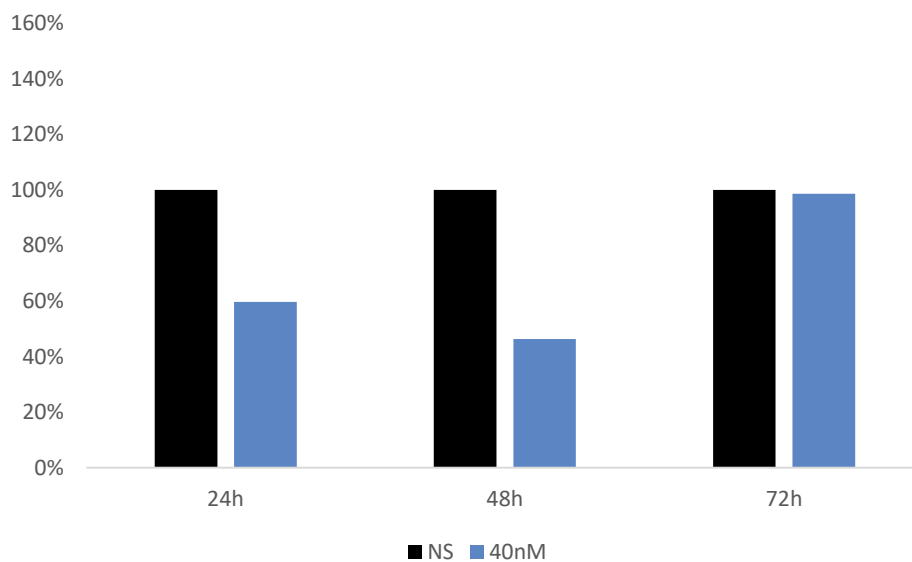


Abbildung 23. Expression von SIRT4 in Cisplatin-resistenten SK-MES Zellen nach Transfektion mit Effektene Reagenz und 40 nM SIRT4 siRNA.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert, 24 h inkubiert und anschließend wurde die Transfektion mit 40 nM HDAC11-siRNA und NS-siRNA (Kontrolle) durchgeführt. Die ersten Proben wurden nach 24 h geerntet, bei restlichen wurde das Medium gewechselt. Weitere Ernten folgten 48 h und 72 h

nach Transfektion. Die Abbildung zeigt die Expression von SIRT4 in Cisplatin-resistenten SK-MES Zellen nach Silencing-Behandlung: 40 nM siRNA im Vergleich zur Kontrolle - gleiche Zellen transfektiert mit 40 nM Non-Silencing RNA (NS). Dargestellt sind Ergebnisse aus einem Versuch, die qTPCR wurde im Duplikat durchgeführt.

Es wurde eine Reduktion der SIRT4 Expression von von 40% nach 24h und 54% nach 48h festgestellt. Nach 72 h wurden keine knock-down Effekte sichtbar.

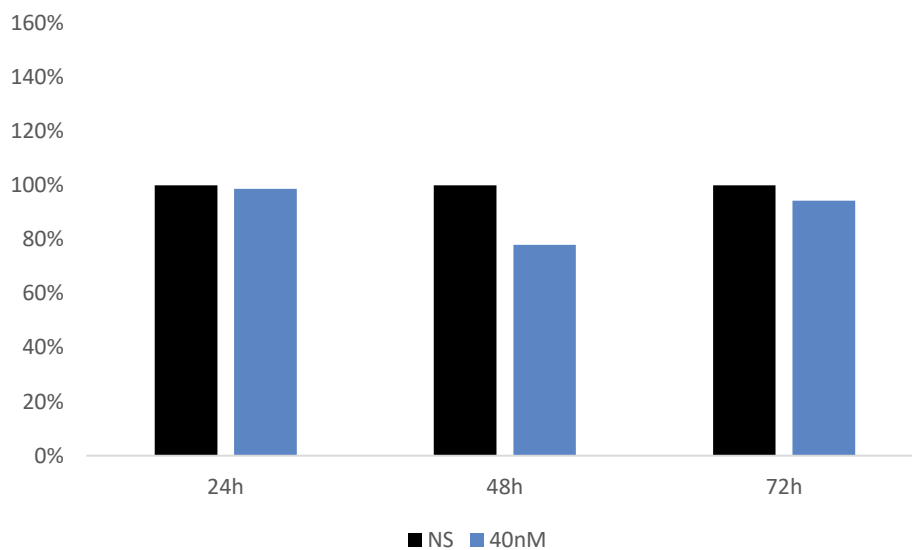


Abbildung 24. Expression von HDAC11 in Cisplatin-resistenten SK-MES Zellen nach siRNA Transfektion mit Effektene Reagenz und 40 nM HDAC11 siRNA.

Es wurden 5×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert, 24 h inkubiert und anschließend wurde die Transfektion mit 40 nM HDAC11-siRNA und NS-siRNA (Kontrolle) durchgeführt. Die ersten Proben wurden nach 24 h geerntet, bei restlichen wurde das Medium gewechselt. Weitere Ernten folgten 48 h und 72 h nach Transfektion. Das Diagramm zeigt die Expression von HDAC11 in Cisplatin-resistenten SK-MES Zellen nach Silencing-Behandlung: 40 nM HDAC11 siRNA im Vergleich zur Kontrolle - gleiche Zellen mit 40 nM Non-Silencing RNA (NS) transfektiert. Dargestellt sind Ergebnisse aus einem Versuch, die qTPCR wurde im Duplikat durchgeführt.

Transfektion von Cisplatin-resistenten SK-MES Zellen mit HDAC11 siRNA zeigte keinen eindeutigen knock-down Effekt. Im Ganzen schien ein Silencing mit vorhandenen Standardmethoden und vorhandenen Transfektionsreagenzien in cisplatinresistenten SK-MES Zellen nicht möglich. Deswegen konzentrierten wir uns in weiteren Versuchen auf A549 Zellen. Es wurden zusätzlich sehr hohe und sehr niedrige siRNA Konzentrationen getestet, um bestmögliche knock-down Effekte zu erreichen.

3.1.5 A549, Cisplatin-resistent: Sirt4 Silencing, JetPrime, 10 nM / 40 nM / 80 nM

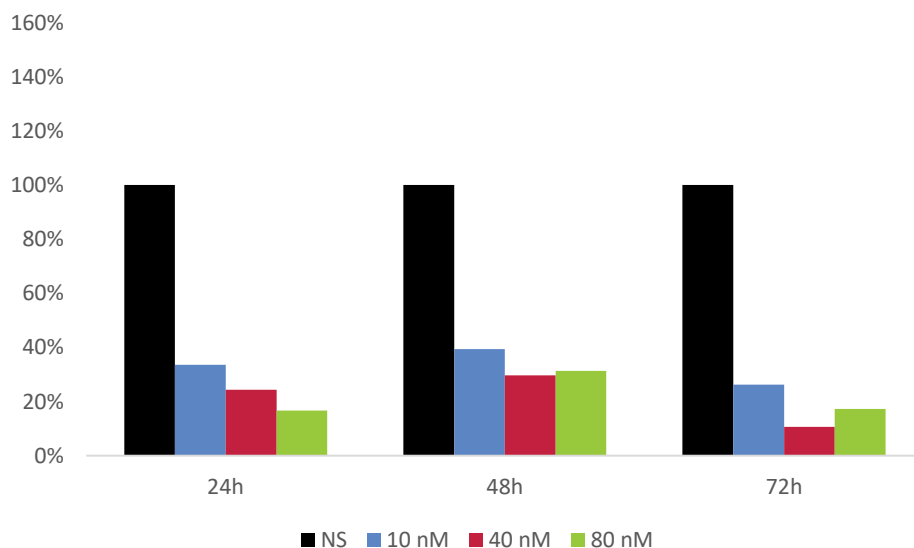


Abbildung 25. Expression von SIRT4 in A549 Zellen nach siRNA Transfektion mit JetPrime, Überprüfung maximaler und minimaler siRNA-Konzentrationen.

Es wurden 8×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert, die Transfektion mit siRNA und NS-RNA nach 24 h durchgeführt, Ernte und Medienwechsel bei restlichen Wells folgten nach 24 h, weitere Ernten nach 48 h und 72 h. Es wurden 8×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert, 24 h inkubiert und anschließend wurde die Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen (10, 20 und 80 nM) von SIRT4-siRNA und 80 nM NS-siRNA (Kontrolle) durchgeführt. Die ersten Proben wurden nach 24 h geerntet, bei restlichen wurde das Medium gewechselt. Weitere Ernten folgten 48 h und 72 h nach Transfektion.

Schaubild zeigt die Expression von SIRT4 in Cisplatin-resistenten A549 Zellen nach unterschiedlichen Transfektionen: siRNA in Konzentrationen 10 nM, 40 nM und 80 nM im Vergleich zur Kontrolle - gleiche Zellen transfektiert mit 80 nM Non-Silencing RNA (NS). Ein Versuch, die qRT-PCR wurde im Duplikat durchgeführt.

Es wurden bei Transfektion mit 10 nM siRNA Expressionen von 34% nach 24h, 40% nach 48h und 26% nach 72h beobachtet. Die höheren SIRT4 siRNA Konzentrationen von 40 nM und 80 nM zeigten mit 24% nach 24h, 30% nach 48h, 11% nach 72h für 40 nM bzw. 17% nach 24h, 31% nach 48h und 17% nach 72h noch bessere Resultate. Zur Bestätigung waren weitere unabhängige Wiederholungen nötig, wobei die 10 nM Konzentration nicht weiter verfolgt wurde.

3.1.6 A549, cisplatin-resistent: HDAC11 Silencing, JetPrime, 10 nM / 40 nM / 80 nM

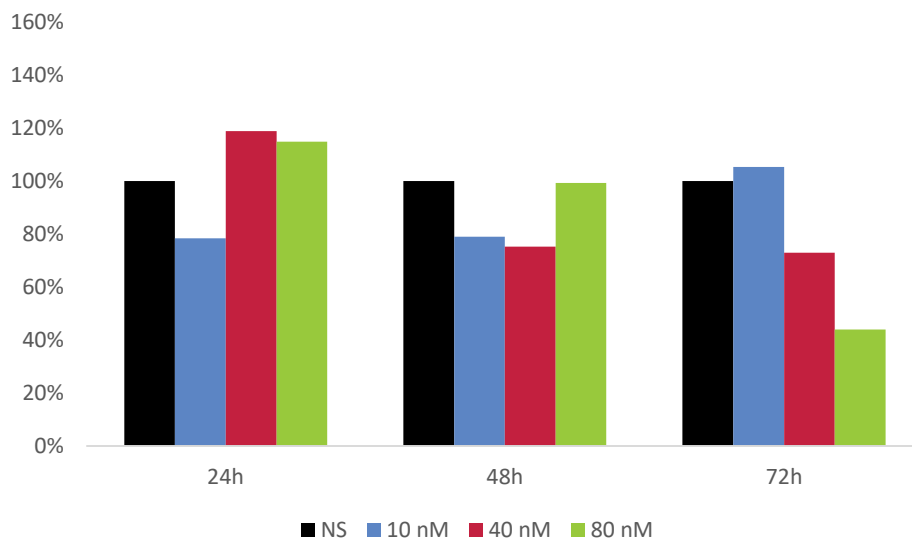


Abbildung 26. Expression von HDAC 11 in A549 Zellen nach siRNA Transfektion mit JetPrime, Test maximaler und minimaler siRNA-Konzentrationen

Es wurden 8×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert, die Transfektion mit HDAC11 siRNA und NS-RNA nach 24 h durchgeführt, Ernte und Medienwechsel bei restlichen Wells folgten nach 24 h, weitere Ernten nach 48 h und 72 h. Schaubild zeigt die Expression von HDAC11 in Cisplatin-resistenten A549 Zellen nach unterschiedlicher Behandlung: siRNA in Konzentrationen von 10 nM, 40 nM und 80 nM im Vergleich

zur Kontrolle - gleiche Zellen transfektiert mit Non-Silencing RNA (NS). Dargestellt sind Ergebnisse aus einem Versuch, die qRT-PCR wurde im Duplikat durchgeführt.

HDAC 11 zeigte in fast allen Proben keine Verringerung der Expression unter 70%. Allein die Behandlung mit 80 nM Reagenz zeigte nach 72 h mit 44% einen verwertbaren Effekt.

3.2 Vergleich der Expression von Sirt4 und HDAC11 in parentalen und Cisplatin-resistenten A549

Eine routinemäßig entnommene Probe zeigte die Infektion mit Mykoplasmen sämtlicher vorhandener Cisplatin-resistenter A549 Zellen. Deswegen war die Validität der bisherigen Ergebnisse in Screening und Silencing Behandlung in Frage gestellt. Um jegliche Kontaminationen ausschließen zu können, wurden neue Zellen von unserem Kooperationspartner Dr. Martin Baar aus Dublin (Irland) bestellt. Diese Zellen wurden hochgezüchtet und nach dem Mykoplasmen Test wurden die Zellstocks im flüssig Stickstoff weggefroren. Die Screening Untersuchungen für SIRT4 und HDAC11 wurden mit neuen Cisplatin-resistenten und parentalen Zellen wiederholt. Drei Wiederholungen mit Duplikaten in der qRT-PCR brachten folgende Ergebnisse.

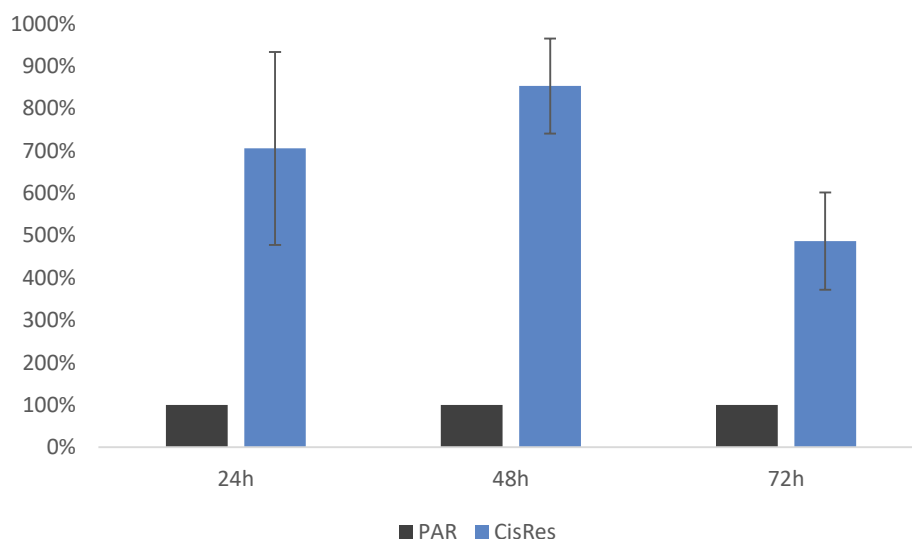


Abbildung 27. Expression von SIRT 4 in A549 Zellen.

Es wurden 8×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert und nach 24 h, 48 h und 72 h geerntet. Schaubild zeigt die Expression von SIRT4 in Cisplatin-resistenten A549 Zellen im Verhältnis zu parentalen A549 Zellen. Es werden Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt. Die qRT-PCR wurde jeweils im Duplikat durchgeführt.

Die angenommene Überexpression von SIRT4 in Cisplatin-resistenten Zellen konnte bestätigt werden. Sie war über die unterschiedlichen Zeitpunkte der Probenentnahme konstant, also nicht durch das Ausplattieren beeinflusst.

Die SIRT4 war mit 682% (6-fach höhere Expression im Vergleich zu parentalen Zellen) als Mittelwert und mindestens 487% bei der Untersuchung nach 72h deutlich überexprimiert. Die vorherigen Screening-Ergebnisse konnten damit bestätigt werden.

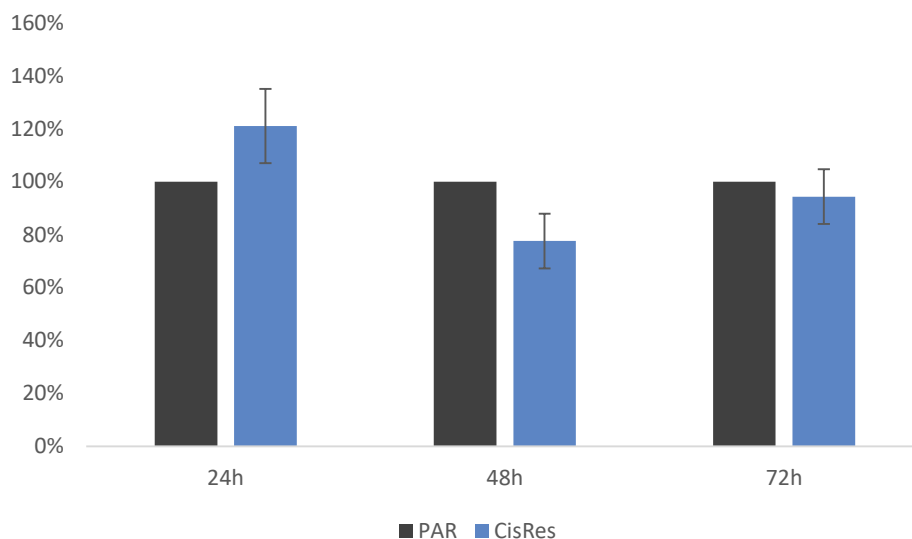


Abbildung 28. Expression von HDAC11 in A549 Zellen.

Es wurden 8×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert. Die Zellen wurden nach 24 h, 48 h und 72 h geerntet. Schaubild zeigt die Expression von HDAC11 in Cisplatin-resistenten A549 Zellen im Verhältnis zu Zellen parentaler Kultur. Es werden Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt. Die qRT-PCR wurde jeweils im Duplikat durchgeführt.

Eine signifikant höhere Expression von HDAC 11 in Cisplatin-resistenten A549 Zellen konnte nicht bestätigt werden. Im vorherigen Screening festgestellte Unterschiede waren vermutlich durch die vorhandene Mykoplasmeninfektion verursacht. Das Silencing von HDAC11 wurde daher nicht weiter verfolgt.

3.2.1 Sirt4 Silencing in cisplatinresistenten A549

Der Silencing Ansatz für SIRT4 in A549 Zellen wurde dreifach wiederholt, die qPCR in Duplikaten durchgeführt.

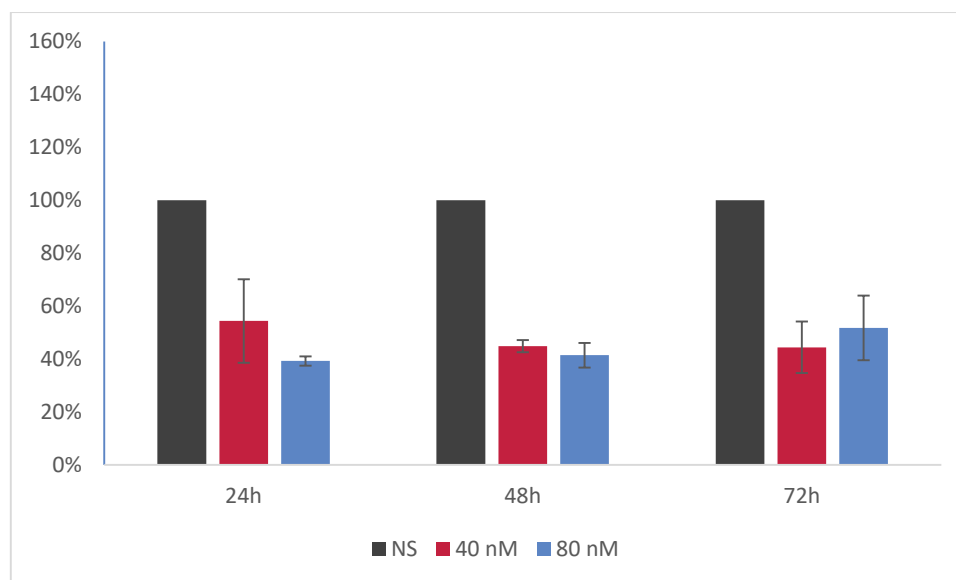


Abbildung 29. Expression von SIRTt 4 in A549 Zellen nach siRNA Transfektion mit JetPrime.

Es wurden 8×10^4 Zellen pro Well in 12 Well Platte ausplattiert. Die Transfektion mit siRNA und NS-RNA wurde nach 24 h durchgeführt, Ernte und Medienwechsel bei restlichen Wells folgten nach 24 h, weitere Ernten nach 48 h und 72 h. Schaubild zeigt die Expression von SIRT4 in Cisplatin-resistenten A549 Zellen nach unterschiedlicher Behandlung: siRNA in Konzentrationen 40 nM und 80 nM im Vergleich zur Kontrolle - gleiche Zellen transfektiert mit 80 nM Non-Silencing RNA (NS). Es werden Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt. Die qRT-PCR wurde jeweils im Duplikat durchgeführt.

Im Vergleich zeigte eine 40 nM Konzentration das beste Resultat. Transfektion mit 80 nM siRNA zeigte nach 24 h mit 39% im Vergleich zu 54% Vorteile, nach 48 h waren sie mit 41% Restexpression in Vergleich zu 45% im Bereich der Messgenauigkeit. Nach 72 h konnte mit 52% zu 44% ein schlechteres Ergebnis beobachtet werden. Es konnte durch das verwendete Silencing-Verfahren mit 40 nM siRNA eine Reduktion der Sirt4-Genexpression auf RNA-Ebene in Cisplatin-resistenten A549 Zellen auf unter 45% des Ausgangswertes reduziert werden. Dieser Effekt war nach 48 h und nach 72 h vorhanden und kann für weitere Versuche verwendet werden.

3.3 Proteinebene

Ziel unserer Silencing Experimente ist es die Expression von Histondeacetylase, des Proteins das aus der RNA translatiert wird zu verringern. Dies wurde durch Immunoblotting nachgewiesen. Die erhältlichen Antikörper gegen SIRT4 reagierten unglücklicherweise sehr unspezifisch. Daher müssen die vom Hersteller empfangenen Antikörper getestet und die Bedingungen unter denen sie die beste Detektionsleistung erbringen festgestellt werden.

3.3.1.1 Optimierung des Sirt4 Antikörpers Santa Cruz H-234

Die Elektrophorese wurde mit 12% PAGE-SDS Gel durchgeführt, transferiert wurde auf Nitrozellulosemembran. Als Verdünnung des Erstantikörpers wurden 1:500 und 1:1000 verwendet, eine nach Herstellerempfehlung mittlere und hohe Verdünnung. Die Blockierung wurde zwischen 5% MTBST 5% und BSA variiert. Der Zweitantikörper wurde 1:2000 verdünnt.

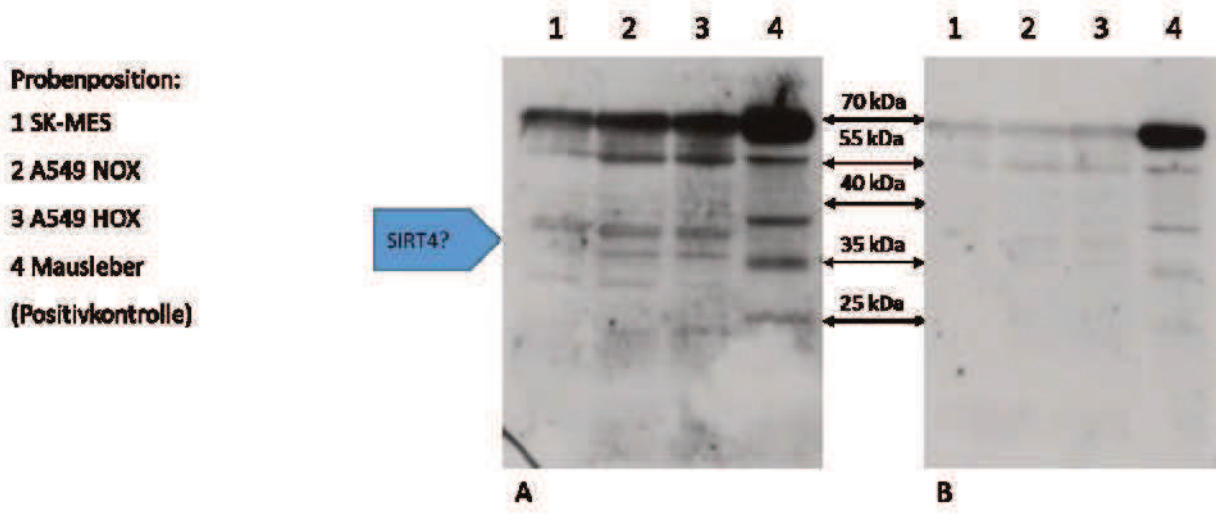


Abbildung 30. Immunoblot für SIRT4 in A549 und SK-MES Zelllinien.

Zwanzig µg Gesamtprotein pro Probe wurde auf einem 12% PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Transferiert wurde auf Nitrozellulose (NC) Membran, der Membranblockierung wurde mit 5% BSA-TBST für 1 h durchgeführt. Verglichen wurden Erstantikörperverdünnungen von 1:500 (A) und 1:1000 (B); Inkubation jeweils bei 4°C über Nacht, nach Waschschrift (TBST 3 x 15 Min.). Inkubation 1h bei RT mit Zweitantikörper, 1:2000 verdünnt. Entwicklung mit ECL-Kit PICO, Aufnahme mit Amersham Hyperfilm ECL. Die blaue Markierung zeigt die erwartete Größe von Sirt4 an.

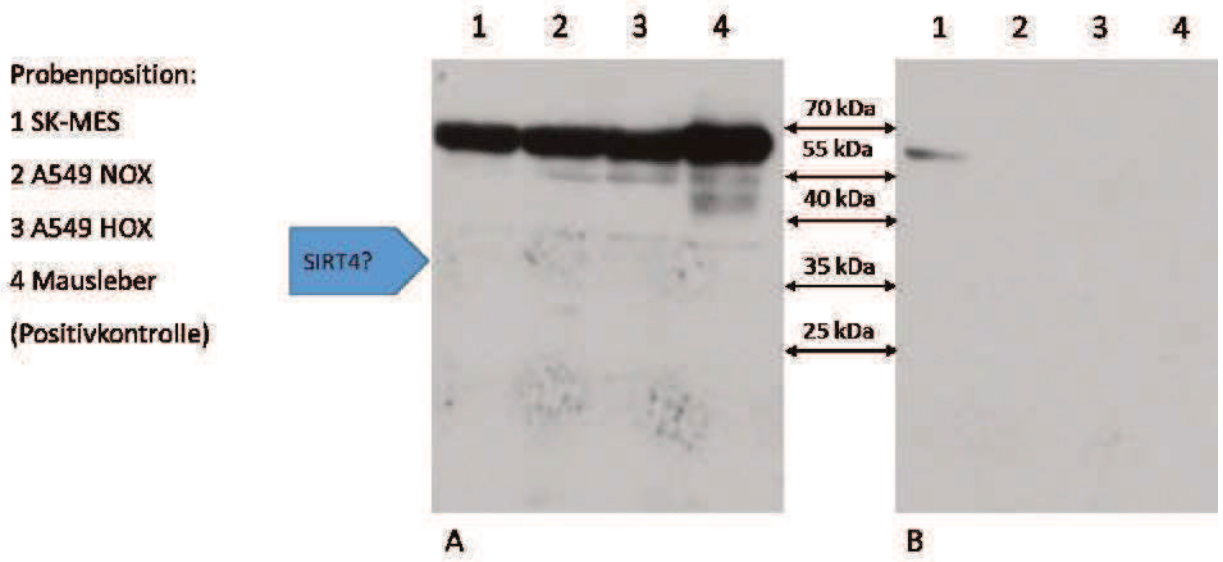


Abbildung 31. Immunoblot für SIRT4 in A549 und SK-MES Zelllinien.

Zwanzig µg Gesamtprotein pro Probe wurde am 12% PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Transferiert wurde auf NC-Membran, der Membranblock mit MTBST durchgeführt. Verglichen wurden Erstantikörperverdünnungen von 1:500 (A) und 1:1000 (B); Inkubation jeweils bei 4°C über Nacht, nach Waschschrift (TBST 3x15 Min.) Inkubation 1h bei RT in Zweitantikörper, 1:2000 verdünnt. Entwicklung mit ECL-Kit PICO, Aufnahme mit Amersham Hyperfilm ECL. Die blaue Markierung zeigt die erwartete Größe von SIRT4 an.

Auf der Abbildung 31 A kann man Artefakte vom Tanktransfer erkennen. Weniger Hintergrundsignal fand sich bei Verwendung von 5% MTBST (Milchpulver in TBST) zur Blockierung in Abbildung 31. Das Signal war bei niedrigerer Erstantikörperverdünnung eindeutiger.

3.3.1.2 Variation von Transfer und Erstantikörperverdünnung

Im nächsten Schritt wurde eine niedrigere Erstantikörperverdünnung und eine PVDF Membran getestet. Zum Transfer wurden die Sandwichhalterungen nochmals gereinigt, der Anpressdruck der Halterung verstärkt und die Filterpapierverkleidung verdoppelt. Zweitantikörperverdünnung wurde beibehalten, Membranblock mit 5% MTBST durchgeführt.

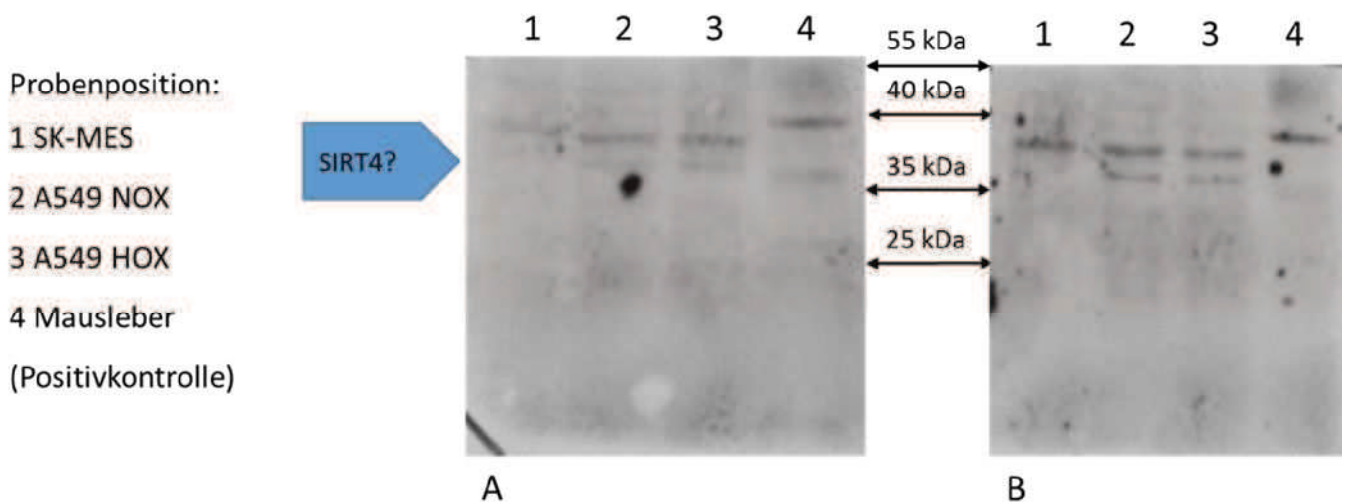


Abbildung 32. Immunoblot für SIRT4 in verwendeten Zelllinien, Membranblock mit MTBST und Test höherer Erstantikörperkonzentrationen.

Zwanzig µg Gesamtprotein pro Probe wurde mit 12% PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Transferiert wurde auf NC-Membran, der Membranblockierung mit 5% MTBST durchgeführt. Verglichen wurden Erstantikörperverdünnungen von 1:500 (A) und 1:300 (B); Inkubation jeweils bei 4°C über Nacht, nach Waschschrift (TBST 3x15 Min.) Inkubation in Zweitantikörper, 1:2000 verdünnt. Entwicklung mit ECL-Kit PICO, Aufnahme mit Amersham Hyperfilm ECL. Die blaue Markierung zeigt die erwartete Größe von SIRT4 an.

Die PVDF-Membran zeigte eine weit unterlegene Bindungsfähigkeit. Eine niedrigere Erstantikörperkonzentration als 1:500 brachte kein stärkeres Signal. Die Verwendung von 5% MTBST zum Membranblockierung war der von 5% BSA-TBST unterlegen.

3.3.1.3 Identifikation des SIRT4 Signals

Um die für SIRT4 spezifische Bande zu finden wurde ein weiterer Immunoblot wurde mit Cisplatin-resistenten A549 Proben durchgeführt, zum Membranblockierung wurde das überlegene 5% BSA-TBST verwendet.

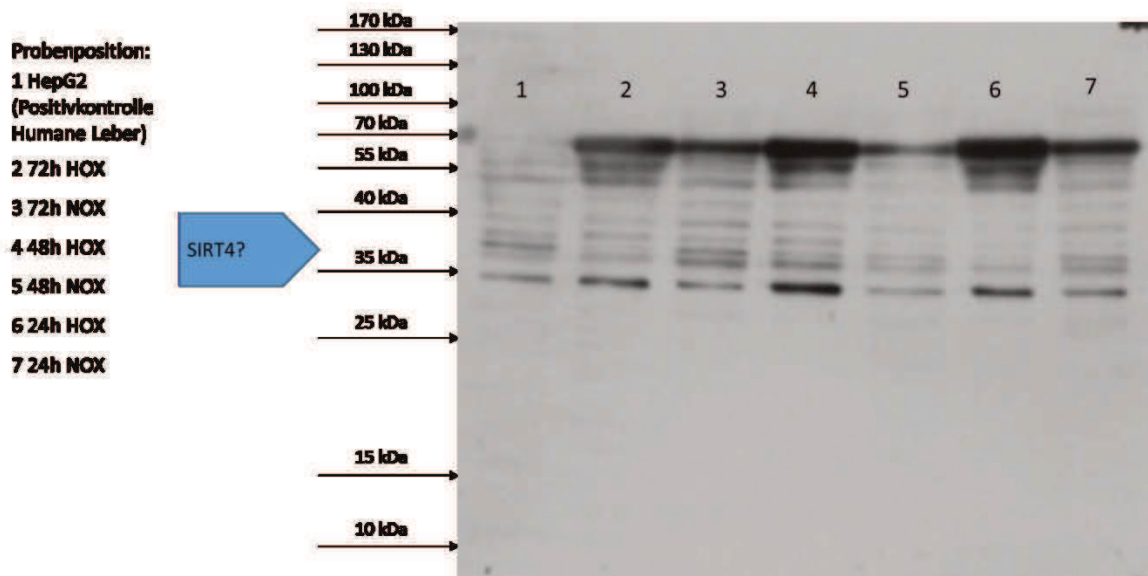


Abbildung 33. Immunoblot für SIRT4 in Cisplatin-resistenten A549 nach Inkubation in normoxischen (NOX, 21%O₂) und hypoxischen (HOX, 1% O₂) Bedingungen.

Zwanzig µg Gesamtprotein pro Probe wurde am 12% PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Transferiert wurde auf NC-Membran, der Membranblockierung mit 5% MTBST durchgeführt. Erstantikörperinkubation in 1:500 Verdünnung bei 4°C über Nacht, nach Waschschrift (TBST 3 x 15 Min.) Inkubation in Zweitantikörper; 1h bei RT, 1:2000 verdünnt. Entwicklung mit ECL-Kit PICO, Aufnahme mit Amersham Hyperfilm ECL. Die blaue Markierung zeigt die erwartete Größe von SIRT4 an.

Es zeigte sich ein gutes Signal zu Hintergrund Verhältnis mit 5% BSA-TBST Blockierung, allerdings bindet der Erstantikörper unspezifisch, was sich in den vielen detektierten Banden zeigt. Liu et al hatten gezeigt, dass in Cardiomyozyten SIRT4 unter hypoxischen Bedingungen vermindert war. Das scheint für A549 Zellen übertragbar zu sein, man erkennt eine starke Bande in der Positivkontrolle (HepG2, humane Leberkarzinomzellen) bei 37 kDa. Diese Bande ist in den A549-Proben nach Hypoxie stets schwächer ausgeprägt als bei Normoxie.

Um diese Bande sicher als die SIRT4 Bande zu identifizieren war ein Silencing Versuch nötig. Es wurden $1,6 \times 10^5$ Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausplattiert, die Transfektion mit siRNA und NS-siRNA nach 24 h durchgeführt, eine erste Ernte und Medienwechsel folgte nach 24 h, die weiteren Ernten nach 48 h und 72 h.



Abbildung 34. Immunoblot für SIRT4 in Cisplatin-resistenten A549 nach Silencing Behandlung.

Zwanzig μg Gesamtprotein pro Probe wurde am 12% PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Transferiert wurde auf NC-Membran, der Membranblockierung mit MTBST durchgeführt. Erstantikörperinkubation in 1:500 Verdünnung bei 4°C über Nacht, nach Waschschrift (TBST, 3x15 Min.) Inkubation in Zweitantikörper, 1:2000 verdünnt. Entwicklung mit ECL-Kit PICO, Aufnahme mit Amersham Hyperfilm ECL. Die blaue Markierung zeigt die erwartete Größe von SIRT4 an.

Die SIRT4 Bande konnte durch den unspezifischen Erstantikörper nicht eindeutig identifiziert werden, da sich mehrere Banden nach der Silencing-Behandlung ein geringeres Signal, also eine verringerte Proteinmenge aufwiesen. Ein weiterer Antikörper wurde beschafft um spezifischere Signale zu erhalten.

3.3.1.4 Optimierung des Sirt4 Antikörpers Sigma Aldrich SAB2500946

Der nächste Antikörper wurde getestet mit einer 5% MTBST Blockierung der Membran und einer mittleren und hohen Antikörperverdünnung von 1:500 und 1:1000.

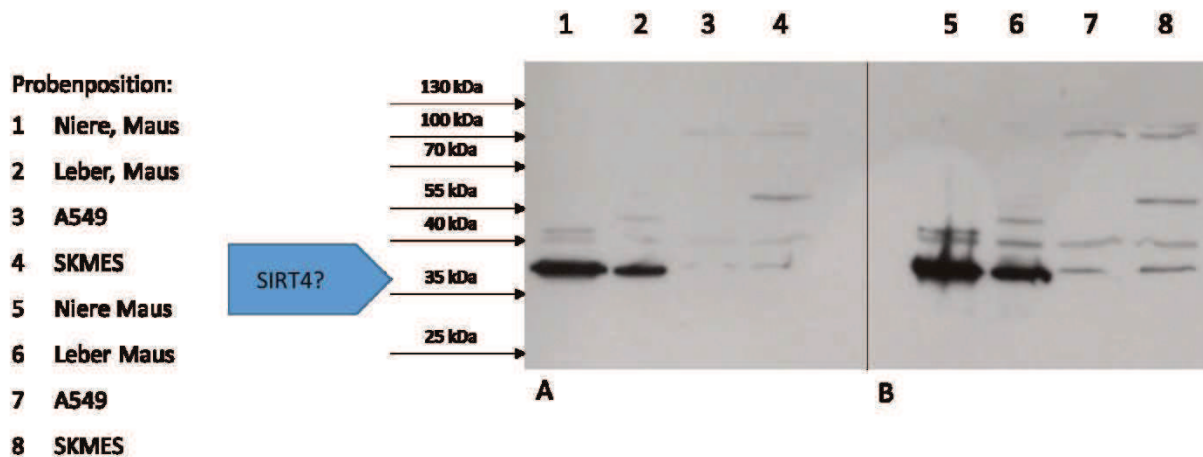


Abbildung 35. Immunoblot für SIRT4 Silencing in Cisplatin-resistenten A549 Zellen.

Zwanzig µg Gesamtprotein wurde am 12% PAGE aufgetrennt; auf NC Membran transferiert, Membranblockierung mit 5% MTBST durchgeführt. Es wurde eine Erstantikörperverdünnung von 1:1000 (A) einer Erstantikörperverdünnung von 1:500 (B) gegenübergestellt. Inkubiert wurde bei 4°C über Nacht, nach Waschschrift (TBST 3 x 15 Min.) Inkubation in Zweitantikörper; 1h bei RT, 1:2000 verdünnt. Entwicklung mit ECL-Kit PICO, Aufnahme mit Amersham Hyperfilm ECL. Die blaue Markierung zeigt die erwartete Größe von SIRT4 an.

Bei der Erstantikörperverdünnung von 1:500 zeigte sich eine höhere Signalstärke in den zu untersuchenden Zellen bei gleichem Hintergrundsignal. Die Blockierung mit MTBST funktionierte bei diesem Antikörper, kein Hintergrundsignal ist zu erkennen. Die Positivkontrollen Mausniere und Mausleber brachten eindeutige Signale und der neue SAB2500946 Antikörper detektierte auch in den zu verwendenden Versuchszelllinien eindeutig die SIRT4 Bande in richtiger Größ

2.3.2 Detektion von SIRT4 Silencing auf Protein Ebene

Um die Effekte der Silencing Behandlung zu untersuchen wurde ein Silencing Versuch zur Proteinernte durchgeführt. Der Versuchsaufbau entsprach der Transfektion, die auf RNA Ebene eine Reduktion der Genexpression von 40% bewirkte. Sowohl parentale als auch Cisplatin--resistente A549 wurden untersucht. Es wurden $1,6 \times 10^5$ Zellen pro Well in 6-Well-Platten ausplattiert, die Transfektion mit 40 nM siRNA und NS-siRNA nach 24 h durchgeführt. Ernte und Medienwechsel bei restlichen Wells folgten nach 24 h, weitere Ernten nach 48 h und 72 h.

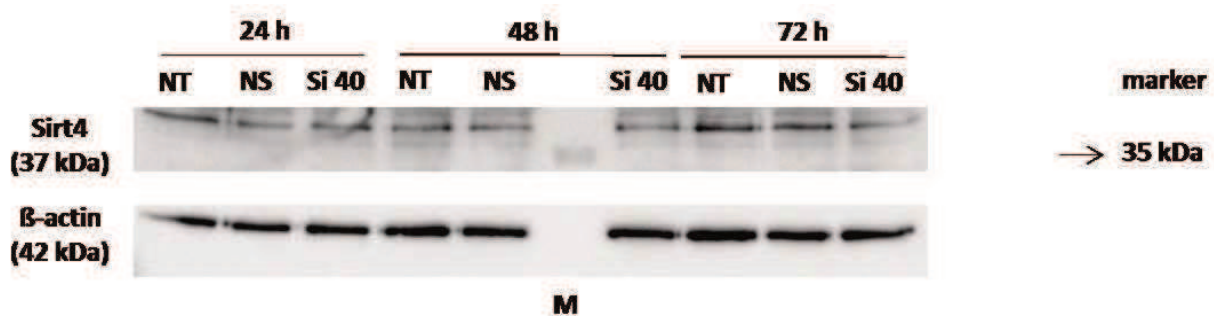


Abbildung 36. Immunoblot für SIRT4 Silencing in Cisplatin-resistenten A549 Zellen.

Zellen wurden in 6-Well-Platten ($1,6 \times 10^5$ pro Well) ausplattiert. Transfektion mit 40 nM SIRT4 siRNA bzw 40 nM siRNA als Negativkontrolle nach 24 h. Ernte und Medienwechsel nach 24 h, nach 48 h und 72 h weitere Ernten. Ernte mit RIPA-Puffer, zusätzlich Ultraschallprozessierung. Elektrophorese mit 20 μ g Protein, bestimmt mit BCA-Photometrie, in 12% SDS-PAGE; Transfer auf Nitrocellulosemembran; Inkubation mit SIRT4 Antikörper, Verdünnung 1:500; Membranblock mit MTBST; Detektion über MRP-markierten Zweitantikörper in 1:2000 Verdünnung und ECL Kit; Aufnahme mit ChemiTouch-Kamera; Proteinmarker: PeqGold IV, Peqlab.

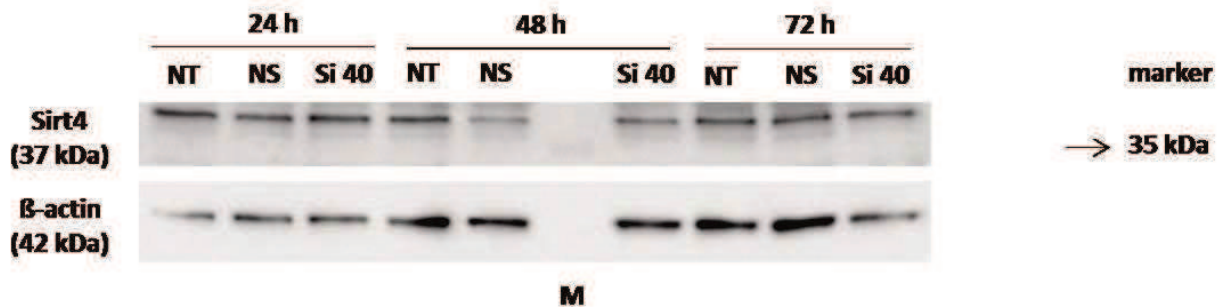


Abbildung 37. Immunoblot für SIRT4 Silencing in parentalen A549 Zellen.

Zellen wurden in 6-Well-Platten ($1,6 \times 10^5$ pro Well) ausplattiert. Transfektion mit 40 nM SIRT4 siRNA bzw 80 nM siRNA als Negativkontrolle nach 24h. Ernte und Medienwechsel nach 24 h, nach 48 h und 72h weitere Ernten. Ernte mit RIPA-Puffer, zusätzlich Ultraschallprozessierung. Elektrophorese mit 20µg Protein, bestimmt mit BCA-Photometrie, in 12% SDS-PAGE; Transfer auf Nitrocellulosemembran; Inkubation mit SIRT4 Antikörper, Verdünnung 1:500; Membranblock mit MTBST; Detektion über MRP-markierten Zweitantikörper in 1:2000 Verdünnung und ECL Kit; Aufnahme mit ChemiTouch-Kamera; Proteinmarker: PeqGold IV,Peqlab. Densitometrische Auswertung dieses Blots ist in Abb. 38 dargestellt.

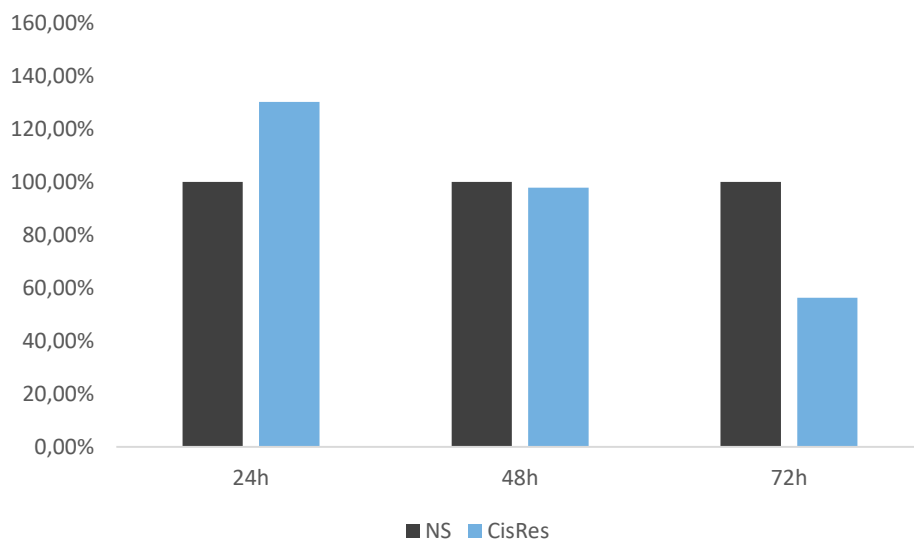


Abbildung 38. Densitometrische Auswertung des Immunoblots (Abbildung 36) mit Image Lab für die Expression von SIRT4 nach Silencing Behandlung. Vergleich Sirt4 siRNA Behandlung zu NS-RNA Behandlung (100%).

Die Sirt 4 Expression war in Cisplatin-resistenten Zellen nach 24 h mit 130% erhöht, nahm aber zum 48 h Zeitpunkt wieder ab auf 98% und fiel nach 72h weiter auf 56% ab. Die Werte der nicht transfizierten Proben (hier nicht gezeigt) und der mit NS-RNA kontrolltransfizierten Proben waren in ihrer SIRT4 Ausprägung vergleichbar, ein Einfluss der Transfektion auf das Zielprotein konnte deswegen ausgeschlossen werden.

3.3.1.5 Wiederholung Sirt 4 Silencing in Cisplatin-resistenten A549

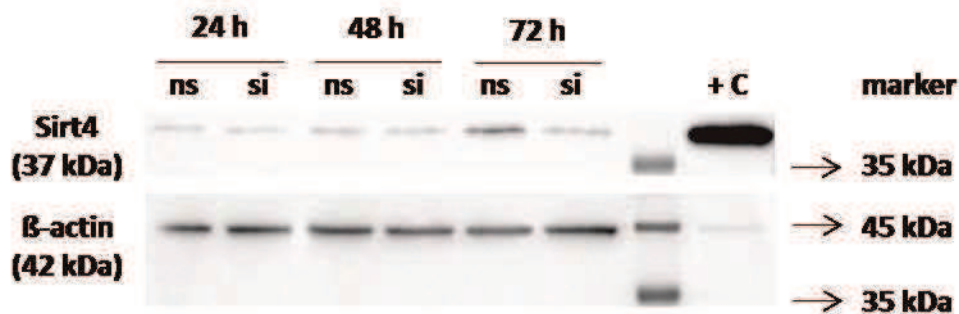


Abbildung 39. Immunoblot für SIRT4 Silencing in Cisplatin-resistenten A549 Zellen.

Zellen wurden in 6-Well-Platten (2×10^5 pro Well) ausplattiert und nach 24 h mit 40 nM SIRT4 siRNA bzw. 40 nM NS-RNA als Negativkontrolle transfiziert. Erste Ernte nach 24 h, bei restlichen Proben wurde Medium gewechselt und nach 48 h und 72 h geerntet. Zellen wurden mit RIPA-Puffer (mit Proteaseinhibitor Cocktail) und mit zusätzlicher Ultraschallprozessierung lysiert. Elektrophorese wurde mit 20 µg Gesamtprotein, bestimmt mit BCA-Photometrie, auf 12% SDS-PAGE durchgeführt. Es erfolgte ein Proteintransfer auf Nitrocellulosemembran und Membranblockierung mit 5% MTBST. Die Membran wurde über Nacht mit SIRT4 Antikörper inkubiert (1:500). Es folgte eine Inkubation mit HRP-markiertem anti-Maus Sekundärantikörper (1:2000 in TBST) für 1h. Nach drei Waschschrritten (je 15 Min.) wurde die Immunoreaktion mit ECL-Kit entwickelt und Signale wurden auf dem ChemiDoc-Touch aufgenommen.

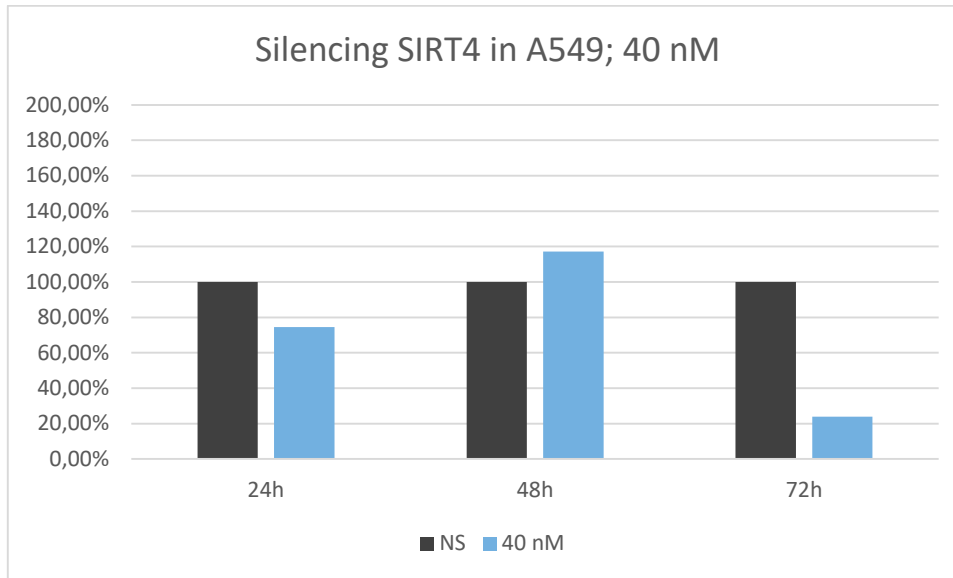


Abbildung 40. Densitometrische Auswertung eines Immunoblots (Abb. 39) nach SIRT4 Silencing. Vergleich von Zelllysaten von mit SIRT4 siRNA transfektierten und mit mit NS-RNA transfektierten Zellen (100%).

Während bei 24 h und 48 h nach Transfektion kaum Unterschiede in der SIRT4 Expression detektierbar sind, zeigte sich nach 72 h eine Reduktion der SIRT4 Expression von 76% im Vergleich zu Kontrollzellen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit stellte sich die untersuchte Überexpression von HDAC11 in vorangegangenen RNA-Vergleichen als mykoplasmeninfektionsbedingtes Artefakt heraus, damit ist diese Histondeacetylase momentan im Hinblick auf die Cisplatinresistenzentwicklung in NSCLC uninteressant. Eine Beteiligung in Immunitätsreaktionen der Zellen erscheint in der Zusammenschau bekannter Publikationen plausibel.

Bei SK-MES-Zellen ließ sich durch die verwendeten Methoden keine suffizienten Silencing Effekte für SIRT4 aufzeigen. Mögliche Ursachen sind, dass die siRNA nicht in die Zelle aufgenommen wird, da die Zellmembran die Mizellen mit eingeschlossener siRNA nicht endozytiert, die Translation langsamer als in den A549 Zellen abläuft und daher die Effekte erst später nach dem Transfektionszeitpunkt auftreten oder die Ziel-RNA der siRNA verändert ist und daher der Effekt ausbleibt. Da bei HDAC11 Silencing Effekte mit dem Jet-Prime Reagenz zu beobachten waren, kann man von einer funktionierenden Endozytose ausgehen. Spätere Untersuchungen nach der Transfektion oder anderen wären interessant um mögliche spätere Effekte auf Proteinebene zu zeigen, darauf wurde in dieser Arbeit aufgrund zeitlicher Restriktion verzichtet. Wahrscheinlich erscheint eine veränderte Ziel-RNA, die andere siRNA Sequenzen benötigt, um den Silencing Effekt zu erreichen.

SIRT4 ist ein epigenetisches Steuerungsenzym, das in Cisplatin-resistenten A549-Zellen stärker exprimiert ist als in parentalen Ausgangszellen. Wir konnten in unserer Arbeit zeigen, dass wir seine Expression durch eine Transfektion mit siRNA auf RNA-Ebene nach 48 h und 72 h auf 45% des Ausgangswertes reduzieren können. Auf Proteinebene konnte eine Verminderung um 76% nach 72 h erreicht werden. Dies eröffnet die Möglichkeit den Einfluss oder gar die Kausalität der festgestellten SIRT4 Überexpression in chemotherapieresistenten A549 Zellen zu untersuchen.

Falls eine Kausalität festgestellt werden kann, eröffnet sich eine neue Therapieoption als Kombinationstherapie von Cisplatin mit SIRT4 wirksamen HDACI und deutlich verbessertem Patientinnen- und Patientenoutcome, möglicherweise die Aussicht auf kurative Therapie des NSCLC.

Limitiert sind die Aussagen dieser Arbeit aufgrund der zeitbedingt geringen Anzahl an

Wiederholungen. Weiters sind zusätzliche Zeitpunkte in der Untersuchung des Verlaufs der Proteinexpression sinnvoll um zu bestimmen wie lange die Silencing Effekte andauern. Diese Effekte sind naturgemäß transient, was den zeitlichen Ablauf folgender Versuche, beispielsweise eines Apoptose-Assays mit Cisplatin-resistenten A549 Zellen mit und ohne SIRT4-Silencing im Vergleich mit parentalen A549 unter Cisplatinbehandlung begrenzt.

Die Schwächen der vorliegenden Arbeit liegen in einer begrenzten Anzahl von Versuchswiederholungen, was die Aussagekraft mindert. Die Anzahl der Untersuchungszeitpunkte nach Transfektion ist auf 72 h begrenzt. Spätere Zeitpunkte sind nötig um die Reaktion auf Cisplatinbehandlung zu untersuchen. Die Behandlung wird nach erfolgter Transfektion stattfinden um Wechselwirkungen wie eine verstärkte Aufnahme in die Zelle auszuschließen. Die Wirkung des Chemotherapeutikums selbst benötigt weiter auch Zeit. Es besteht die Gefahr, dass der Effekt der Silencing Behandlung innerhalb dieser Zeitspanne bereits abnimmt oder ganz erloschen ist und den Versuchsaufbau entwertet.

Man muss weiters die Relation zwischen der SIRT4-Expression in parentalen A549 Zellen und den Cisplatin-resistenten Zellen sehen. In den Voruntersuchungen war SIRT4 22,3-fach vermehrt in RNA Cisplatin-resistenter Zellen zu finden. Bei der maximal nachgewiesenen Reduktion von 45% bleibt SIRT4 immer noch gut 10-fach überexprimiert. Fraglich bleibt ob resultierende Effekte im folgenden Apoptoseassay nachweisbar werden.

SIRT4 scheint in bisherigen Studien als zentrales metabolisches Steuerungsenzym auf. Damit die Zelle auf veränderte Umweltbedingungen adäquat und rasch reagieren kann wäre eine ebenfalls rasche Translation und kurze Halbwertszeit sinnvoll. Als Hungerenzym könnte es die Replikationsrate bei geringem Nährstoffangebot verringern und damit die Cisplatinwirkung verlangsamen, die Behandlungseffekte also erst zu späterem Zeitpunkt ersichtlich werden. Diese Eigenschaften verschärften das Problem der nur transienten Wirkung einer Silencing Behandlung zusätzlich.

Gesunde Körperzellen wären bei klinischer Anwendung ebenso von einer durch HDACI – gehemmten SIRT4 Expression betroffen. Der fehlende kanzeroprotektive Effekt des Enzyms (38) könnte das ohnehin kanzerogene Potential des Cisplatins weiter aggravieren. Dies gilt es im Sinne der Patientensicherheit vor jeglichem klinischem Einsatz auszuschließen.

Grundsätzlich stellt sich stets die Frage inwieweit die Effekte in der Zellkultur auf Patienten übertragbar sind, die in Zellkulturuntersuchungen verwenden Cisplatinkonzentrationen werden so in der Therapie nicht erreicht, das Milieu von Zellkontakten im Gewebeverband und Hormonwirkung im Organismus werden nicht abgebildet. Die bestehenden Zelllinien sind sehr heterogen; einerseits muss die interindividuelle Variabilität der Zellen bedacht werden, zusätzlich bei Tumorzellen die erhöhte Mutationsrate und dadurch vermehrte Diversität. Die beobachteten Unterschiede in der Transfektion unterschiedlicher Zelllinien zeigten dies deutlich. Auch die erworbene Resistenz kann sich in anderen Zellpopulationen im Mechanismus unterscheiden, das schränkt die Aussagekraft der folgenden Untersuchungen ein.

Andererseits werden die möglichen Resistenzen eine begrenzte Anzahl an Mechanismen rekrutieren. Nach vorangegangener immunhistochemischer Typisierung von Probeexzisionen könnten diese mit gezielten Kombinationen von Chemotherapeutikum und entsprechenden HDACs beantwortet werden und das Outcome von Patienten mit NSCLC in fortgeschrittenen Stadien deutlich verbessern.

Über klinische Effekte lässt sich im momentanen Stadium der Grundlagenforschung nur spekulieren. Während einige Arbeiten über HDAC Inhibitoren eine gute Wirksamkeit und geringe Nebenwirkungen erwarten lassen (8) wurden in einer Phase I/II Studie von Tambo an Patientinnen und Patienten mit NSCLC im Stadium IIIB und IV nach Umstellung der Therapie auf Doxetacel, einem Taxan, und Resminostat, einem Inhibitor von HDAC 1,3,6 und 8, ein verschlechtertes Outcome im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Doxetacel festgestellt. Die Kombination erhöhte das Risiko von Leukopenie, febriler Neutropenie, Thrombozytopenie und Appetitlosigkeit signifikant (58). Durch die verfügbare Zeit zur Laborarbeit sind nur eine begrenzte Anzahl an Versuchen möglich gewesen, zu definitiver Validität sind weitere Wiederholungen nötig. es konnten allerdings Hypothesen abgewägt, mögliche experimentelle Ansätze ausgeschlossen und eine Methode etabliert werden.

SIRT4 in Lungenkarzinomzellen ist bisher unerforscht. Primäre Anwendung der optimierten Techniken wird eine Untersuchung der Wirkung der Silencing Behandlung auf die Wirkung von Cisplatin auf die verwendete Zellkultur sein. Fraglich bleibt, ob der entstandene Effekt messbar

wird, gerade weil ein durch Silencing bewirkter Effekt transient ist, dh. höchstens 5 Tage anhält. Die vorhandene Silencing Methode ist auch einsetzbar um weitere Wirkungen von SIRT4 in NSCLC aufzuklären. Die Mechanik der Apoptosemodulation, metabolischer Veränderungen und von Resistenzeffekten unter Hypoxie, die Lius Arbeiten an Kardiomyozyten zeigten, sind weitere Herausforderungen für die Grazer Pulmonologie bei deren Bewältigung vorliegende Arbeit helfen kann.

5 Literaturverzeichnis

- 1 Clegg A, Scott DA, Sidhu M, Hewitson P, Waugh N. A rapid and systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of paclitaxel, docetaxel, gemcitabine and vinorelbine in non-small-cell lung cancer. *Health Technol Assess.* 2001;5(32):1-195.
- 2 Griesinger Prof. Dr. med. Frank. Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC); Oktober 2012. Abgerufen von: <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/lungenkarzinom-nicht-kleinzellig-nsclc>
- 3 Kartalou M, Essigmann JM. Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res.* 2001 Jul 1;478(1-2):23-43.
- 4 Barr MP, Gray SG, Hoffmann AC, Hilger RA, Thomale J, et al. (2013) Generation and Characterisation of Cisplatin-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines Displaying a Stem-Like Signature. *PLoS ONE* 8(1): e54193.
- 5 Perez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer.* 1998 Sep;34(10):1535-42. Review.
- 6 HDAC inhibitors and cancer therapy. Atadja PW. *Prog Drug Res.* 2011;67:175-95. Review. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21141730>
- 7 Fischer C, Leithner K, Wohlkoenig C, Quehenberger F, Bertsch A, Olschewski A, Olschewski H, Hrzenjak A. Panobinostat reduces hypoxia-induced cisplatin resistance of non-small cell lung carcinoma cells via HIF-1 α destabilization. *Mol Cancer.* 2015 Jan 21;14(1):4. doi: 10.1186/1476-4598-14-4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25608569>
- 8 Wang G, Edwards H, Caldwell JT, et al. Panobinostat Synergistically Enhances the Cytotoxic Effects of Cisplatin, Doxorubicin or Etoposide on High-Risk Neuroblastoma Cells. Sarkar D, ed. *PLoS ONE.* 2013;8(9):e76662. doi:10.1371/journal.pone.0076662.

- 9 Denis Mottet, Vincent Castronovo. Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2008, Volume 25, Number 2, Page 183
- 10 Acharya M, Sparreboom A, et al. Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review. *Molecular Pharmacology*. 2005;68:917–32
- 11 Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011;21:381-95
- 12 Cesare Gridelli, Antonio Rossi, Paolo Maione. The potential role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* Volume 68, Issue 1, October 2008, Pages 29-36
- 13 Geneviève P Delcuve, Dilshad H Khan, James R Davie. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clinical Epigenetics*, 2012, Volume 4, Number 1, Page 1
- 14 Lane AA, Chabner BA. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol* 2009;27:5459-68.
- 15 Glozak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 2007;26:5420-32.
- 16 Pandolfi PP. Histone deacetylases and transcriptional therapy with their inhibitors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;48:Suppl 1:S17-9.
- 17 Yang XJ, Seto E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):206–218.
- 18 Tanner KG, Landry J, Sternglanz R, Denu JM. Silent information regulator 2 family of NAD-dependent histone/protein deacetylases generates a unique product, 1-O-acetyl-ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(26):14178–14182.
- 19 Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799(10–12):717–725.
- 20 Ocker M. Deacetylase inhibitors – focus on non-histone targets and effects. *World J Biol Chem*. 2010;1(5):55–61
- 21 Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. 2005;363:15–23.

- 22 Spange S, Wagner T, Heinzl T, Krämer OH. Acetylation of non-histone proteins modulates cellular signalling at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(1):185–198.
- 23 Marks PA. The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010;19(9):1049–1066.
- 24 Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P, Verdin E. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*. 2007;282:33583–33592. doi: 10.1074/jbc.M705488200.
- 25 Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem*. 2005;280:17187–17195. doi: 10.1074/jbc.M501250200.
- 26 Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, Craddock C, Turner BM. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*. 2005;19:1751–1759.
- 27 Voelter-Mahlknecht S, Mahlkecht U. The sirtuins in the pathogenesis of cancer. *Clinical Epigenetics*. 2010;1(3-4):71-83.
- 28 Ahuja N, Schwer B, Carobbio S, Waltregny D, North BJ, Castronovo V, Maechler P, Verdin E. Regulation of insulin secretion by SIRT4, a mitochondrial ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*. 2007;282(46):33583–33592.
- 29 Laurent G, German NJ, Saha AK, de Boer VC, Davies M, Koves TR, Dephore N, Fischer F, Boanca G, Vaitheesvaran B, Lovitch SB, Sharpe AH, Kurland IJ, Steegborn C, Gygi SP, Muoio DM, Ruderman NB, Haigis MC. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA decarboxylase. *Mol Cell*. 2013;50(5):686–698.
- 30 Pebay-Peyroula E. and Brandolin G. Nucleotide exchange in mitochondria: insight at a molecular level. *Curr Opin Struct Biol* 14: 420–425, 2004
- 31 Kersten S., Seydoux J., Peters JM., Gonzalez FJ., Desvergne B., and Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 103: 1489–1498, 1999
- 32 Leone TC., Weinheimer CJ., and Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7473–7478, 1999

- 33 Liu, Ban & Che, Wenliang & Xue, Jinsong & Zheng, Changzhu & Tang, Kai & Zhang, Jingying & Wen, Jing & Xu, Yawei. (2013). SIRT4 Prevents Hypoxia-Induced Apoptosis in H9c2 Cardiomyoblast Cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 32. 655-662.
- 34 Fernandez-Marcos PJ1, Serrano M. Sirt4: the glutamine gatekeeper. *Cancer Cell*. 2013 Apr 15;23(4):427-8.
- 35 Cosentino C, Grieco D, Costanzo V. ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *EMBO J*. 2011;30:546–555.
- 36 (Zhou et al., 2002.
- 37 Jeong SM., Xiao C., Finley LWS., Lahusen T., Souza AL., Pierce K., Li Y-H., Wang X., Laurent G., German NJ., Xu X., Li C., Wang R-H., Lee J., Csibi A., Cerione R., Blenis J., Clish CB., Kimmelman A., Deng C-X., and Haigis MC. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. *Cancer Cell* 23: 450–463, 2013
- 38 Jeong SM., Lee A., Lee J., and Haigis MC. SIRT4 protein suppresses tumor formation in genetic models of Myc-induced B cell lymphoma. *J Biol Chem* 289: 4135–4144, 2014
- 39 Chen Y., Wang H., Luo G., and Dai X. SIRT4 inhibits cigarette smoke extracts-induced mononuclear cell adhesion to human pulmonary microvascular endothelial cells via regulating NF-kappaB activity. *Toxicol Lett* 226: 320–327, 2014
- 40 Gao et al., 2002 ?HDAC11?
- 41 Functional Analysis of Histone Deacetylase 11 (HDAC11).
Chen J, Sahakian E, Powers J, Lienlaf M, Perez-Villarroel P, Knox T, Villagra A. *Methods Mol Biol*. 2016;1436:E1
- 42 Daniela Buglio, Noor M. Khaskhely, Kui Shin Voo, Hector Martinez-Valdez, Yong-Jun Liu, Anas Younes. HDAC11 plays an essential role in regulating OX40 ligand expression in Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2011 Mar 10; 117(10): 2910–2917. Prepublished online 2011 Jan 14.
- 43 Vibe Skov, Thomas Stauffer Larsen, Mads Thomassen, Caroline Hasselbalch Riley, Morten K. Jensen, Ole Weis Bjerrum, Torben A. Kruse & Hans Carl Hasselbalch. Increased gene expression

of histone deacetylases in patients with Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Leukemia & Lymphoma* Vol. 53 , Iss. 1,2012

44 Gottesman, S (2004). The small RNA regulators of *Escherichia coli*: Roles and mechanisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 58, 303-328.

45 Lee, RC, Feinbaum, RL and Ambros, V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.

46 Wightman, B, Ha, I and Ruvkun, G (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.

47 Lee, RC and Ambros, V (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 862-864.

48 Lau, NC, Lim, LP, Weinstein, EG, and Bartel, DP (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-862.

49 Lagos-Quintana, M, Rauhut, R, Lendeckel, W and Tuschl, T (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.

50 Van der Krol, A, Mur, L, Beld, M, Mol, JNM, and Stuitje, AR (1990). Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-299.

51 Van Blokland, K, van der Geest, N, Mol, J, and Kooter, J (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J.* 6, 861-877.

52 Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C.: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391, 1998, S. 806–811. PMID 9486653.

53 Sayda M. Elbashir, Jens Harborth, Winfried Lendeckel, Abdullah Yalcin, Klaus Weber & Thomas Tuschl. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498 (24 May 2001)

54 Robinson R. RNAi Therapeutics: How Likely, How Soon? *PLoS Biology* Vol. 2, No. 1, e28.

- 55 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(9):4350-4354.
- 56 U. K. Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*. Bd. 227, 1970, S. 680–685.
- 57 Thorpe, G. H. G., Kricka, L. J., Mosely, S. B. and Whitehead, T. P. Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: Application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. *Clin. Chem*. 31:1335-1341(1985)
- 58 Tambo, Y., Hosomi, Y., Sakai, H. et al. *Invest New Drugs* (2017) 35: 217.